

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Genetická determinace fixace CO₂ u C₃ a C₄ rostlin

Lenka Fridrichová

Školitel: RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Praha 2008

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Daně Holé, Ph.D. za podanou pomocnou ruku při sepisování bakalářské práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím uvedené odborné literatury a souhlasím s jejím zveřejněním.

V Horní Cerekvi 10.8.2008

Fridrichová
.....

Lenka Fridrichová

Obsah

Abstrakt.....	3
1 Seznam použitých zkratk.....	5
2 Úvod.....	6
3 Používané metody a organismy při studiu genetické determinace typů fotosyntézy.....	9
4 Varianty fotosyntézy	10
4.1 C3 typ metabolismu	10
4.1.1 Enzymy C3 fotosyntézy	14
4.1.1.1 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa.....	14
4.1.1.2 3-fosfoglycerátkinasa	15
4.1.1.3 Glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa.....	16
4.1.1.4 Triosafosfátizomerasa	17
4.1.1.5 Fruktosa-1,6 bisfosfát/sedoheptulosa-1,7-bisfosfát aldolasa	17
4.1.1.6 Fruktosa-1,6-bisfosfatasa	17
4.1.1.7 Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa	18
4.1.1.8 Transketolasa.....	18
4.1.1.9 Ribulosa-5-fosfát-3-epimerasa	18
4.1.1.10 Ribosa-5-fosfátizomerasa.....	19
4.1.1.11 Fosforibulosokinasa	19
4.2 C4 typ metabolismu	19
4.2.1 Varianty C4 fotosyntézy.....	22
4.2.1.1 NADP-ME varianta.....	23
4.2.1.2 NAD-ME varianta	23
4.2.1.3 PEPCK varianta.....	24
4.2.2 Enzymy C4 fotosyntézy	25
4.2.2.1 Karbonátdehydratasa.....	25
4.2.2.2 Fosfoenolpyruvátkarboxylasa	26
4.2.2.3 Pyruvát-fosfátdikinasa.....	27
4.2.2.4 NADP-malátdehydrogenasa.....	28
4.2.2.5 NADP-dependentní jablečný enzym.....	28
4.2.2.6 NAD-dependentní jablečný enzym	29
4.2.2.7 Fosfoenolpyruvátkarboxykinasa	29
4.3 CAM typ metabolismu	29
4.3.1 Klíčové enzymy CAM fotosyntézy.....	34
4.3.1.1 Fosfoenolpyruvátkarboxylasa	34
4.3.1.2 NADP-malát dehydrogenasa, NAD-malátdehydrogenasa.....	35
4.3.1.3 NADP dependentní jablečný enzym	35
4.3.1.4 Pyruvátfosfátdikinasa	35
4.3.1.5 Fosfoenolpyruvátkarboxykinasa	36
5 Závěr.....	36
6 Literatura	37

OPRAVNÝ LIST bakalářské práce Genetická determinace fixace CO₂ u C3 a C4 rostlin

chybně → správně

str. 2 Fruktosa-1,6 bisfosfát/sedoheptulosa-1,7-bisfosfát aldolasa
→ Fruktosa-1,6- bisfosfát/sedoheptulosa-1,7-bisfosfát aldolasa

str. 5 řádek „NADPH- ME NADPH- dependentní jablečný enzym“ je nadbytečný

str. 5 sedoheptulosa-7-bisfosfát → sedoheptulosa-7- fosfát

str. 9 cDNA (complementary DNA), knihovnou → cDNA (complementary DNA) knihovnou

str. 12 obr.4 chybí vysvětlení zkratk (mělo by být vloženo před (*podle Pavlová, 2005, upraveno*))

*ADP – adenosindifosfát, ATP – adenosintrifosfát, CO₂ – oxid uhličitý,
GAP - glyceraldehyd-3-fosfát, NADP⁺ - oxidovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát,
NADPH – redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát, O₂ – kyslík, P_i – anorganický fosfát*

str. 20 nadbytečné řádkování mezi „vyskytuje“ a „tzv. Kranz-anatomie“

str. 24 obr. 7 (pravá horní část obrázku) NADP-ME → NADP-MDH

str. 25 obrázek Obr. 7. → Obr. 8.

str. 29 OAA + ATP → PEP + ADP → OAA + ATP → PEP + ADP + CO₂

str. 32 tab. 2.

<i>Hydrocharitaceae</i>	<i>Hydrilla</i>
<i>Lamiaceae</i>	<i>Vallisneria</i> <i>Plectranthus</i>

→

<i>Hydrocharitaceae</i>	<i>Hydrilla</i> <i>Vallisneria</i>
<i>Lamiaceae</i>	<i>Plectranthus</i>

str. 36 OAA + ATP → PEP + ADP → OAA + ATP → PEP + ADP + CO₂

str. 13, 22, 24, 25, 26, 31 v popisích obrázků 4-9 chybí mezera před číslicí

str. 23, 33 v popisích tabulek chybí tečka za číslicí

v celé práci jsou použity nadbytečné závorky u zkratky autora uváděné u vědeckých názvů rostlinných druhů

Prosím čtenáře o prominutí výše uvedených chyb

Eudochora
autorka práce

Abstrakt

Fotosyntéza je důležitá metabolická dráha, která je charakteristická pro fotoautotrofní organismy a slouží k zabudování CO_2 do organických látek. Fixace CO_2 se u vyšších rostlin uskutečňuje během Calvinova cyklu, který je lokalizován v chloroplastech, fotosyntetických organelách přítomných v buňkách listů a některých dalších orgánů většiny rostlinných druhů. Rostliny, jejichž sekundární fází fotosyntézy představuje samotný Calvinův cyklus, se označují jako C_3 rostliny (patří k nim většina rostlinných druhů). U některých rostlin probíhají za účelem zvýšení koncentrace CO_2 v místech Calvinova cyklu ještě další reakce a takové rostliny jsou označovány jako C_4 a CAM. Tyto reakce se pravděpodobně vyvinuly jako adaptace na nepříznivé podmínky prostředí, zejména takové podmínky, které vyžadují omezení zbytečných ztrát vody její expirací v nevhodnou dobu.

Calvinova cyklu se účastní jedenáct enzymů. Některé z nich se vyskytují i v jiných kompartmentech buňky, nejen v chloroplastech. Existují obvykle ve více izoformách a totéž lze prohlásit i o enzymech C_4 nebo CAM rostlin, katalyzujících přídatné reakce fixace CO_2 . Exprese genů kódujících tyto enzymy je řízena různými mechanismy, které se uplatňují na různých úrovních cesty od genu k plně funkčnímu proteinu. S rozvojem metod molekulární biologie v posledních desetiletích se výzkumem vybraných druhů C_3 , C_4 a CAM rostlin získaly mnohé poznatky o struktuře, řízení exprese a vzájemném vlivu enzymů zapojených do dějů fixace CO_2 , regulaci exprese jejich genů a pravděpodobných mechanismech uplatňujících se v evoluci těchto genů. Tato práce se snaží stručně shrnout současný stav znalostí o mechanismech C_3 , C_4 a CAM fixace CO_2 u vyšších rostlin a jejich genetické determinaci.

Klíčová slova

C_3 rostliny, C_4 rostliny, CAM rostliny, fixace CO_2 , fotosyntéza, izoformy enzymů, lokalizace enzymů, řízení genové exprese

Abstract

Genetic determination of CO₂ fixation in C3 and C4 plants

Photosynthesis is an important metabolic pathway characteristic for photoautotrophic organisms. It is necessary for the fixation of CO₂ into organic compounds. The fixation of CO₂ in higher plants proceeds through so-called Calvin cycle which takes place in the stroma of chloroplasts – photosynthetic organelles present in cells of leaves and other organs of the majority of plant species. Plants that fixate CO₂ only by the Calvin cycle are known as C3 plants (the majority of higher plant species belongs to this group). Some plants have developed additional metabolic pathways in order to selectively increase the concentration of CO₂ for its subsequent fixation by the Calvin cycle enzymes. These species are known as C4 and CAM plants. Such pathways probably evolved in order to enable plants to adapt to unfavourable environment, particularly to such conditions that would require the limitation of water loss caused by its expiration at wrong time.

Eleven enzymes are involved in the Calvin cycle. Several of them are located not only in chloroplasts but also in other compartments of a cell. The Calvin cycle enzymes usually exist in several isoforms; this applies also for the enzymes of C4 or CAM plants, participating in the accessory reactions of CO₂ fixation. The expression of genes coding for these enzymes is regulated by various mechanisms at different levels of the pathway from gene to mature protein. During the last decade or two, the development of molecular biology methods and the research made on selected species of C3, C4 and CAM plants brought new information about the structure of enzymes involved in the fixation of CO₂, the regulation of expression of their genes and the probable mechanisms of their evolution. This thesis attempts to briefly summarize current knowledge on C3, C4 and CAM mechanisms of CO₂ fixation in higher plants, and their genetic determination.

Key words

C3 plants, C4 plants, CAM plants, CO₂ fixation, control of gene expression, enzyme isoforms, localization of enzymes, photosynthesis

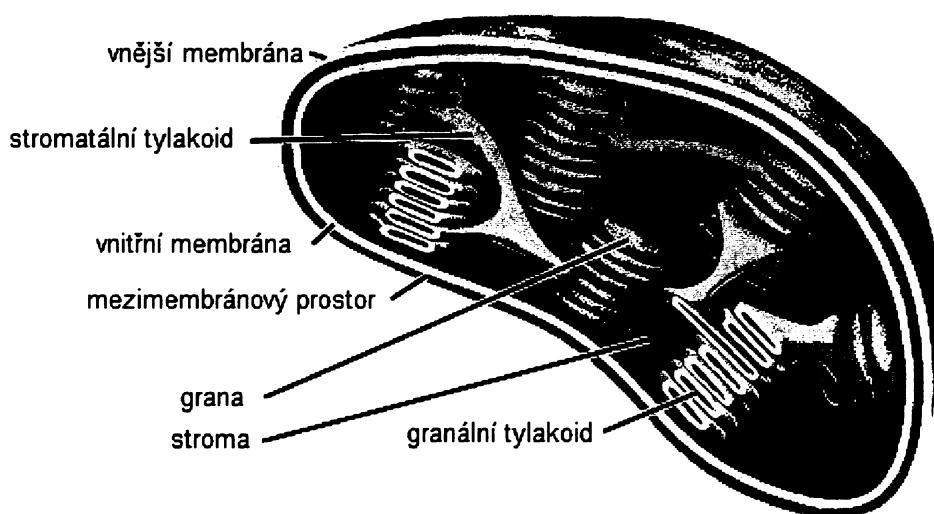
1 Seznam použitých zkratk

1,3-BPGA	1,3-bisfosfoglycerát
3-PGA	3-fosfoglycerát
AMP	adenosinmonofosfát
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
C3	typ rostlin, u nichž jsou produktem fixace CO ₂ tříuhlíkaté sloučeniny
C4	typ rostlin, u nichž je produktem fixace CO ₂ čtyřuhlíkatá sloučenina
CA	karbonátdehydratasa, též karboanhydratasa
CAM	typ rostlin, které mají shodný sled reakcí jako C4 typ, liší se způsobem oddělení procesů fixace CO ₂ a jeho zabudování do organických látek
CBB cyklus	Calvin-Benson-Basshamův cyklus
CF	ATP syntasa
CO ₂	oxid uhličitý
DHAP	dihydroxyacetonfosfát
DNA	kyselina deoxyribonukleová
E-4-P	erytrosa-4-fosfát
F-1,6-BP	fruktosa-1,6-bisfosfát
F-6-P	fruktosa-6-fosfát
FBA	fruktosa-1,6-bisfosfát/sedoheptulosa-1,7-bisfosfátaldolasa
FBP	fruktosa-1,6-bisfosfatasa
Fd	ferredoxin
GA-3-P, též GAP	glyceraldehyd-3-fosfát
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
H ⁺	proton
HCO ₃ ⁻	hydrogenuhličitanový anion
H ₂ O	voda
k _m	Michaelisova konstanta
LHC	světlosběrný komplex
ME	jablečný enzym
mRNA	mediátorová kyselina ribonukleová
NADP ⁺	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADP-MDH	NADP-malátdehydrogenasa
NAD-ME	NAD-dependentní jablečný enzym
NADP-ME	NADP-dependentní jablečný enzym
NADPH-ME	NADPH-dependentní jablečný enzym
OAA	oxalacetát
OEC	komplex uvolňující kyslík
PC	plastocyanin
PCR	fotosyntetický redukční cyklus uhlíku
PEP	fosfoenolpyruvát
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa
PEPCK	fosfoenolpyruvátkarboxykinasa
PGK	3-fosfoglycerátkinasa
P _i	anorganický fosfát
PP _i	anorganický difosfát
PPDK	pyruvát-fosfátkinasa
PQ	plastochinon
PRK	fosforibulokinasa
PS I	fotosystém I
PS II	fotosystém II
RPE	ribulosa-5-fosfát-3-epimerasa
RPI	ribosa-5-fosfátizomerasa
Ru-1,5-BP	ribulosa-1,5-bisfosfát
R-5-P	ribosa-5-fosfát
Ru-5-P	ribulosa-5-bisfosfát
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
SBP	sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa
Su-1,7-BP	sedoheptulosa-1,7-bisfosfát
Su-7-P	sedoheptulosa-7-bisfosfát
TKL	transketolasa
TPI	triosafosfátizomerasa
WUE	efektivita využití vody
Xu-5-P	xylulosa-5-fosfát

2 Úvod

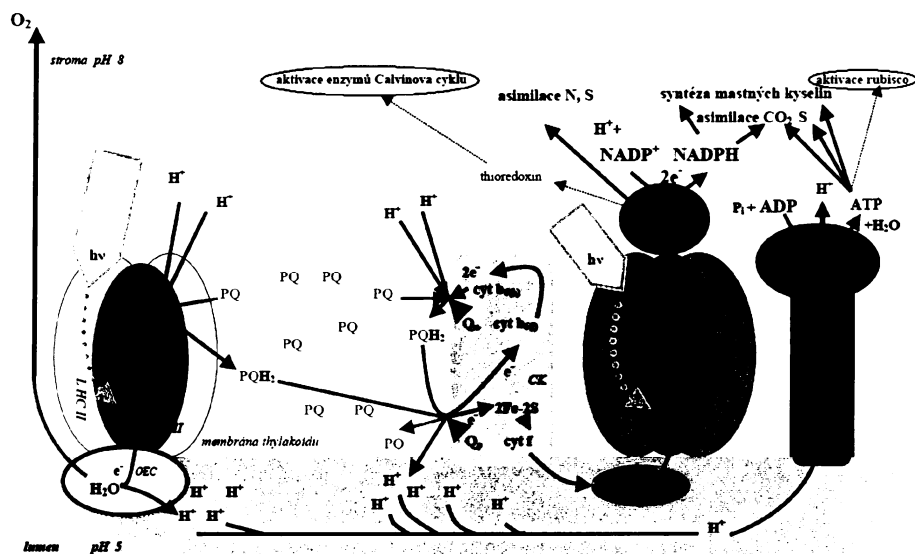
Fotosyntéza je proces odehrávající se u rostlin v zelených částech těla, ve specializovaných buněčných organelách – chloroplastech, především v buňkách listového mezofylu. Během fotosyntézy se energie slunečního záření po pohlcení mění v energii chemických vazeb organických látek. Nejvíce energie je spotřebováno při fixaci a redukci CO_2 a následné syntéze asimilátů sacharidového typu, tedy při dějích sekundární (označované též syntetická a méně vhodně i temnotní) fáze fotosyntézy. V sekundární fázi fotosyntézy se k tvorbě organických látek využívají produkty fáze primární (světelné) – ATP, redukované formy ferredoxinu a NADPH. Tyto látky vznikají díky energii světelného záření, které je pohlceno fotosyntetickými pigmenty – chlorofyly, karotenoidy.

Primární fáze fotosyntézy probíhá na specifických strukturách umístěných v tylakoidní membráně chloroplastů (Obr. 1, Obr. 2), které slouží k transportu elektronů a fotofosforylaci. Jsou jimi fotosystém II (PS II) s komplexem uvolňujícím kyslík (OEC, oxygen-evolving complex), fotosystém I (PS I), cytochromový komplex b_6f , komplex syntetizující ATP (ATP-syntasa, též CF, coupling factor) a komplexy světlosběrných antén (LHC, light-harvesting complexes). Mimo komplexy se dějů primární fáze účastní mobilní molekuly přenášející elektron – plastochinon (PQ), plastocyanin (PC) a ferredoxin (Fd).



Obr. 1. Základní struktury chloroplastu

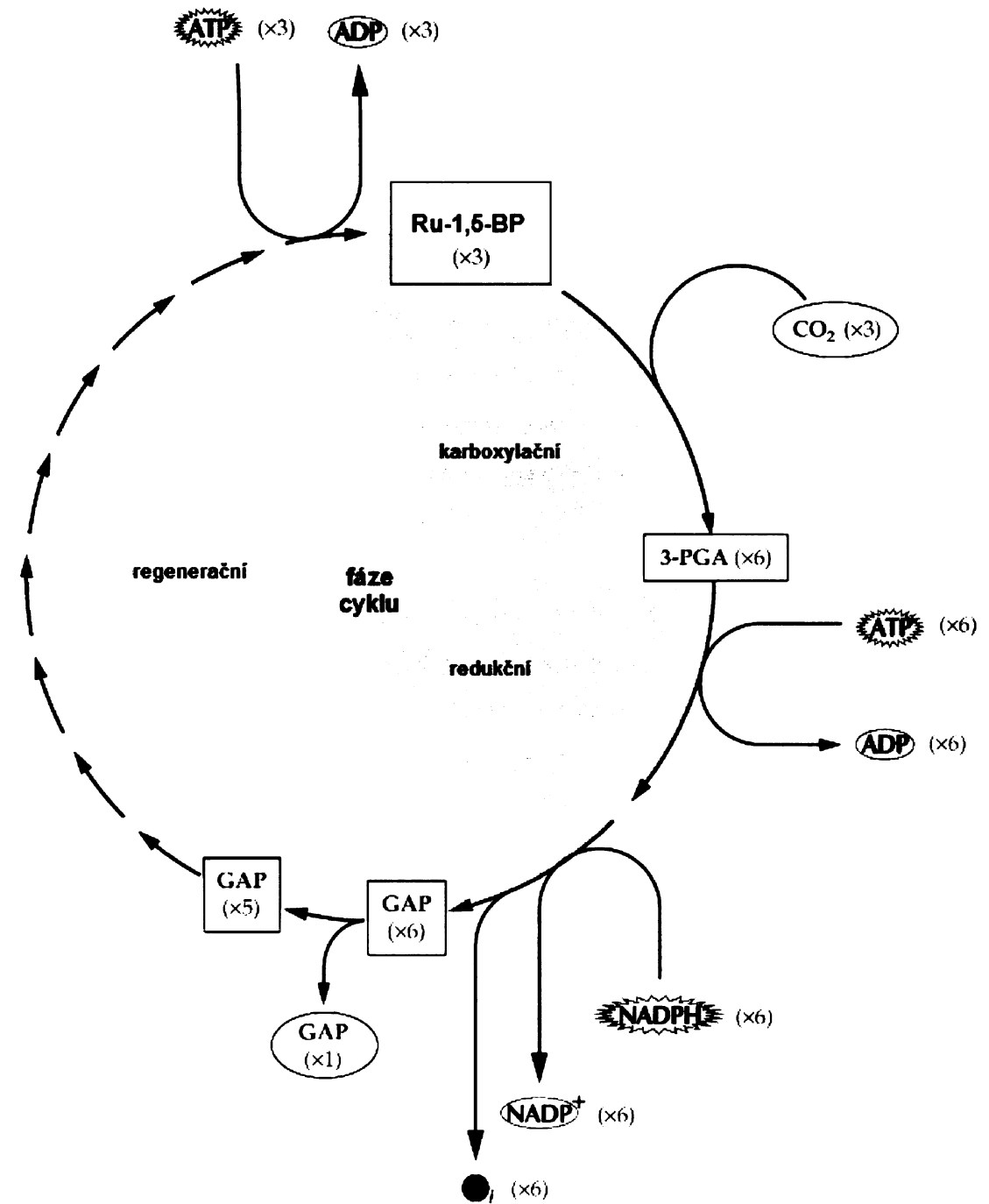
(podle www.biomed.cas.cz/mbu/gabriel/Biochemie%20II.ppt, upraveno)



Obr. 2. Schéma primární fáze fotosyntézy, zakresleny jsou využitě struktury, produkty, průběh přenosu elektronů (a protonů) i vztah k sekundární fázi fotosyntézy (označen černými ovály). Tmavozeleně je znázorněn komplex fotosystému II (obklopený komplexy světlosběrných antén a s komplexem uvolňujícím vodu (světledodry) na lumenální straně tylakoidní membrány), světlezeleně je znázorněn komplex fotosystému I (opět obklopený komplexy světlosběrných antén), oranžově je znázorněn cytochromový komplex bf, červeně je znázorněna ATP-syntasa (CF₀/CF₁), modře plastocyanin (PC), tmavooranžově ferredoxin. Zkratky v rámci jednotlivých komplexů představují dílčí přenašeče elektronů.

(podle Pavlová 2005, upraveno)

Sekundární fáze se odehrává ve stromatu chloroplastu (Obr. 1). Hlavním metabolickým procesem je Calvin-Benson-Basshamův cyklus (zkráceně Calvinův cyklus, někdy též nazývaný fotosyntetický redukční cyklus uhlíku, PCR) s několika fázemi – karboxylační, redukční a regenerační (Obr. 3). Během fáze karboxylační je CO₂ fixován na ribulosa-1,5-bisfosfát enzymem ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasou, vznikají přitom dvě molekuly kyseliny 3-fosfoglycerové. Ke spotřebě produktů primární fáze fotosyntézy a redukcí kyseliny 3-fosfoglycerové na 3-fosfoglyceraldehyd dochází během fáze redukční; při fázi regenerační se po karboxylaci regeneruje původní substrát a vznikají sacharidy s různým počtem atomů uhlíku. Ty slouží jako zásobárna energie, či se po transportu do jiných organel účastní dalších procesů v buňce (glykolýzy, Krebsova cyklu, procesů dýchacího řetězce). Z hexos se v chloroplastu syntetizuje škrob, erytroza-4-fosfát je využit společně s fosfoenolpyruvát (transportovaným z cytosolu) k syntéze aromatických aminokyselin, ribosa-5-fosfát je použit na tvorbu nukleových kyselin (Raines and Lloyd, 2007).



Obr. 3. Schematický průběh Calvinova cyklu, zachycen počet molekul produktů a meziproduktů.

3-PGA – 3-fosfoglycerát, ADP – adenosindifosfát, ATP – adenosintrifosfát, CO_2 – oxid uhličitý,

GAP - glyceraldehyd-3-fosfát, NADP^+ - oxidovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát, NADPH – redukováný nikotinamidadenindinukleotidfosfát, P_i – anorganický fosfát, Ru-1,5-BP – ribulosa-1,5- bisfosfát.

(podle Buchanan et al., 2000, upraveno)

U některých rostlinných druhů předchází Calvinovu cyklu fixace hydrogenuhlíčitanového anionu na fosfoenolpyruvát, jejímž produktem je čtyřuhlíkatá látka – oxalacetát (Voet and Voet, 1995; Hatch, 2002). Podle počtu uhlíků prvního produktu se tento typ fixace CO₂ nazývá C4 cyklus (Calvinův cyklus je ze stejného důvodu nazýván cyklus C3). C4 cyklus (též nazýván cyklus Hatchův-Slackův-Kortschakův) se vyskytuje u tzv. C4 a CAM rostlin. U C4 rostlin jsou C4 a C3 cykly odděleny prostorově, u rostlin CAM časově. Rostliny C4 a CAM jsou přizpůsobeny anatomicky, fyziologicky a biochemicky na prostředí suchých stanovišť s vysokou teplotou a ozářeností, kde jsou zvýhodněny vůči rostlinám C3. Metabolismus C4 a CAM se pravděpodobně vyvinul z C3 metabolismu zafixováním genetických změn – mutací, které vedly k potlačení ztrát CO₂ procesem fotorespirace (též glykolátová cesta) a zvyšovaly hodnotu efektivity využití vody (WUE) (Martin *et al.*, 2000).

Tato práce se zabývá variantami fixace CO₂ u vyšších rostlin, regulací aktivity enzymů metabolických drah sekundární fáze fotosyntézy i regulováním exprese jejich genů a genetickými modifikacemi, které vedly ke vzniku několika typů fotosyntetického metabolismu a jsou zodpovědné za anatomické, fyziologické a biochemické adaptace rostlin na podmínky stanoviště, na kterém se vyskytují.

3 Používané metody a organismy při studiu genetické determinace typů fotosyntézy

Ke studiu genů kódujících enzymy fixace CO₂ u vyšších rostlin se dnes používá řady metod. K důležitým patří zjišťování sekvence porovnáváním zkoumaných částí genomu s cDNA (complementary DNA), knihovnou pro daný rostlinný druh. Vzájemnou podobnost genů odhaluje srovnávací hybridizace. Ke zkoumání detailního průběhu metabolických drah jsou vytvářeny transgenní rostliny, které mají pozměněnou genetickou informaci (Raines, 2003). Transgenní rostliny se získávají vnesením cizího genu do jejich genomu pomocí vektoru, nebo naopak se u nich některý gen inaktivuje a poté jsou sledovány změny metabolické dráhy rostlin, se kterou vnesený či inaktivovaný gen souvisí. Sleduje se také, jak druhy s daným typem fotosyntézy reagují na různé abiotické stresové faktory (mj. na rostoucí obsah CO₂ v atmosféře (Moore, 1994)).

Ke studiu typů fotosyntézy se vybírají rostlinné druhy, které mají výhodné vlastnosti (krátký životní cyklus, malé rozměry, nízké kultivační nároky) pro pěstování v laboratorních podmínkách, či jsou významnými zemědělskými plodinami (především obilniny). Hodně jsou

studovány i rody, které obsahují druhy s různými typy fotosyntézy, či dokonce druhy C3-C4 přechodné (Brown *et al.*, 2005).

4 Varianty fotosyntézy

4.1 C3 typ metabolismu

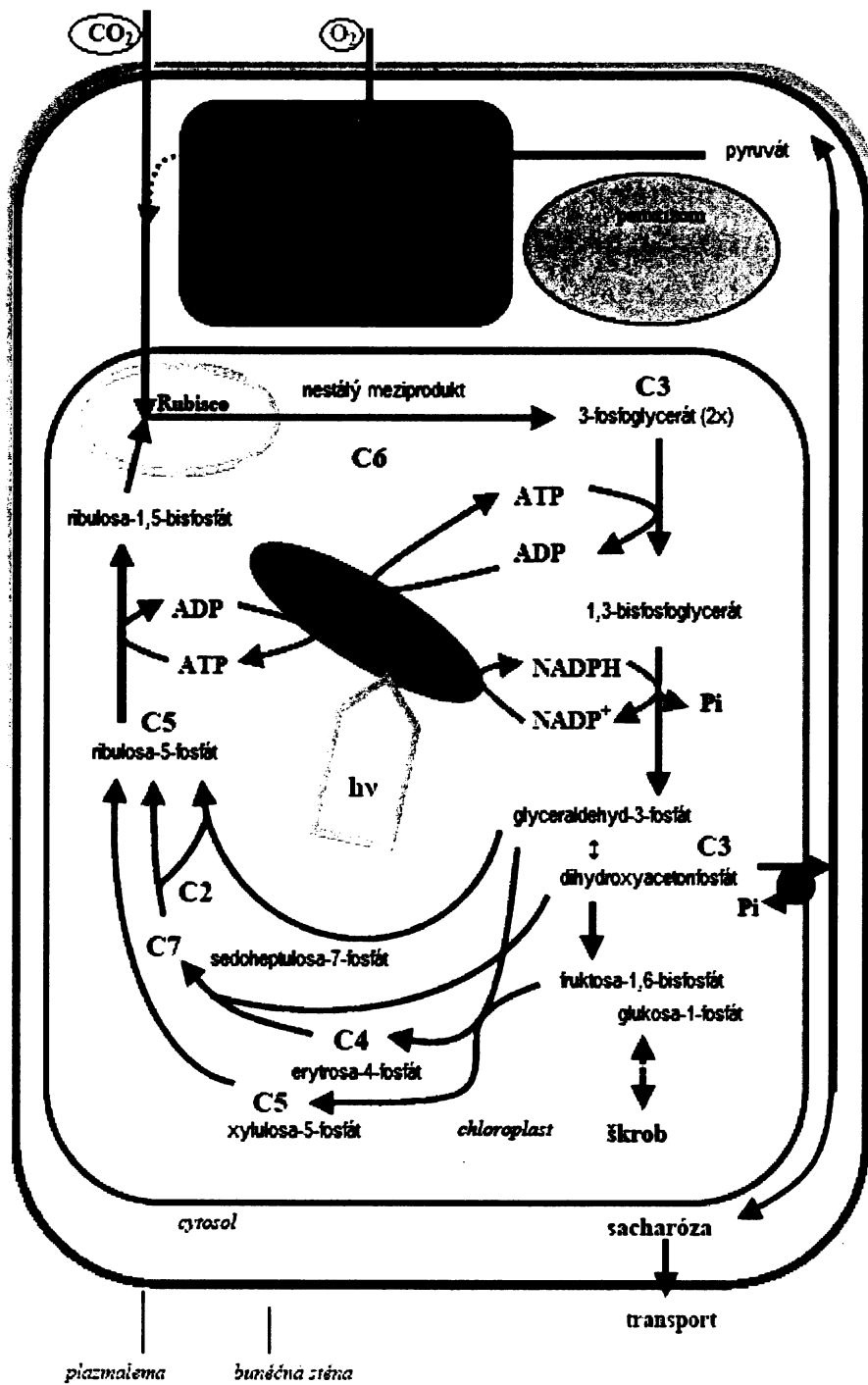
Více než 90 % terestrických druhů rostlin asimiluje CO₂ cestou C3 metabolismu (Ku *et al.*, 1996). Anatomickým znakem listu většiny C3 rostlin je rozlišení mezofylu na houbový a palisádový parenchym. Účinnost C3 cyklu je ovšem omezena nízkou afinitou enzymu Rubisco k atmosférickému CO₂ (Griffiths, 2006; Tcherkez *et al.*, 2006), se kterou souvisí fotorespirace, proces probíhající v chloroplastech, peroxizómech a mitochondriích. Ztráty CO₂ fotorespirací nejsou zanedbatelné a zvyšují se s rostoucí teplotou prostředí (Portis, 2002).

Fixace CO₂ cestou C3 byla poprvé popsána v 50. letech 20. století v práci Calvina, Basshama a Benson, vycházející ze série studií řasy *Chlorella sp.* (Leegood *et al.*, 2000; Raines and Lloyd, 2007). Calvinův cyklus (též fotosyntetická redukce uhlíku, cyklus redukující pentosafosfát, Benson-Calvinův cyklus, Calvin-Benson-Basshamův cyklus, CBB cyklus) je souborem reakcí fixujících CO₂ a zároveň regenerujících původní substrát (Obr. 4). Během asimilace jedné molekuly CO₂ jsou spotřebovány tři molekuly ATP a dvě molekuly NADPH (Grace, 2004). C3 cyklus je autokatalytický, je schopen produkce metabolitů, které jsou využity v něm samém, či v jiných drahách – biosyntéze škrobu, sacharosy, izoprenoidů, kyseliny šikimové i ostatních složek vyžadovaných pro růst a vývoj rostlin. Pět ze šesti molekul metabolitů produkovaných během cyklu je potřeba na obnovu substrátu pro fixaci CO₂, čistým produktem je každá šestá molekula triosafosfátu (glyceraldehyd-3-fosfát či dihydroxyacetonfosfát), která opouští chloroplast či je použita v syntéze škrobu (Raines and Lloyd, 2007).

Reakcí Calvinova cyklu se účastní celkem jedenáct enzymů. Jsou jimi: ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco); 3-fosfoglycerátkinasa (PGK); glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH); triosafosfátizomerasa (TPI); fruktosa-1,6-bisfosfát/sedoheptulosa-1,7-bisfosfátaldolasa (FBA); fruktosa-1,6-bisfosfátasa (FBP); sedoheptulosa-1,7-bisfosfátasa (SBP); transketolasa (TKL); ribulosa-5-fosfát-3-epimerasa (RPE); ribosa-5-fosfátizomerasa (RPI); fosforibulokinasa (PRK). Enzymy C3 cyklu jsou lokalizovány ve stromatu chloroplastů. Metabolická dráha zřejmě nevznikla *de novo* v rostlinách, má původ v eubakteriích, ze kterých se vyvinuly endosymbiotické organely (Martin *et al.*, 2000).

Geny kódující enzymy Calvinova cyklu jsou u eukaryotických fotosyntetických organismů jaderné, pouze velká podjednotka Rubisco je kódována v chloroplastové DNA. U mnohých studovaných fotosyntetizujících bakterií jsou tyto enzymy kódovány *cbb* operonem. Syntéza enzymů probíhá v cytosolu, na N-konci mají tranzitní peptid, který je směřuje do chloroplastu. Exprese genů C3 cyklu je významně ovlivněna světlem, již během jedné hodiny po vystavení světlu se u rostlin předtím umístěných ve tmě výrazně zvýší hladina mRNA kódované těmito geny. Většina dosud odhalených kontrolních mechanismů probíhá na úrovni transkripční regulace genové exprese. Maximální hladiny mRNA se dosáhne po 1-2 dnech normálního režimu střídání světla a tmy (Raines and Lloyd, 2007).

Enzymy jsou ve většině případů tvořeny více podjednotkami (jen PGK je aktivní ve formě monomeru). Do dvou tříd – I, II - se řadí enzymy se shodnou funkcí, ale odlišnou strukturou. Ze studií fotosyntetických enzymů u *Spinacia* sp. vyplývá, že pět z jedenácti enzymů má izoformy, které se v cytosolu účastní glykolýzy a glukoneogeneze (Martin and Schnarrenberger, 1997).



Obr.4. Schéma reakcí Calvinova cyklu
(podle Pavlová, 2005, upraveno)

C3 cyklus je regulován dostupností ATP a NADPH - produktů primární fáze fotosyntézy, vliv na aktivitu enzymů cyklu má světlo a thioredoxin. Odpověď rostlin na světlo je zprostředkována řadou fotoreceptorů (fytochrom, kryptochrom). Za tmy je téměř inaktivních 5 enzymů (Rubisco, GAPDH, FBP, SBP, PRK) (Buchanan, 1991; Ruelland and Miginac-Maslow, 1999; Raines and Lloyd 2007). Po začátku světelné periody je aktivita těchto enzymů obnovena během 5-30 minut. Aktivace C3 cyklu vyžaduje redukční ekvivalenty z primární fáze fotosyntézy. V redukujícím místě fotosystému I dochází k přenosu elektronů z ferredoxinu na thioredoxin f (což katalyzuje enzym ferredoxin/thioredoxinreduktasa). Thioredoxin je malý stromatální protein (12 kDa) obsahující vysoce konzervativní sekvenci aminokyselin (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys). Je schopný reverzibilně oxidovat a redukovat disulfidové skupiny, působí tedy jako proteindisulfidoxidoreduktasa. Na světle se redukovaný thioredoxin váže na cysteinové zbytky výše uvedených (mimo enzymu Rubisco) čtyř enzymů Calvinova cyklu (neaktivní formy těchto enzymů mají cysteinové zbytky propojeny disulfidickými vazbami). Po navázání thioredoxinu vznikají dvě thiolové skupiny a je umožněna změna konformace vedoucí k aktivaci fotosyntetických enzymů. Proces inaktivace je méně objasněný, není závislý na oxidované formě thioredoxinu (Martin *et al.*, 2000). Ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasa/oxygenasa se způsobem regulace od ostatních enzymů liší (viz.kapitola 4.1.1.1).

Podíl na regulaci C3 cyklu má i vznik přechodných multimerických komplexů z enzymů cyklu, které soustřeďují metabolické intermediáty a zvyšují účinnost cyklu. Nejlépe prostudován je komplex GAPDH, PRK a proteinu CP12 přítomný u rostlin za tmy (Wedel, 1997; Raines, 2003). Protein CP12 (kódovaný jaderným genomem) je tvořen přibližně 75 aminokyselinami uspořádanými do centrálního α helixu obklopeného dvěma konzervativními očkami. C-koncová smyčka je téměř identická s C-terminální sekvencí chloroplastové GAPB (podjednotky B enzymu GAPDH), proto zřejmě hraje roli při vzniku hexadekamerní formy enzymu GAPDH (A8B8), která je vytvořena ze čtyř tetramerů A2B2. Enzym PRK se při vzniku komplexu váže k N-koncové aminokyselinové sekvenci proteinu CP12. Disociace komplexu GAPDH, PRK, proteinu CP12 je závislá na NADPH (Raines and Lloyd, 2007).

4.1.1 Enzymy C3 fotosyntézy

4.1.1.1 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa

EC 4.1.1.39

Katalyzovaná reakce : Ru-1,5-BP + CO₂ → 3-PGA + 3-PGA

(navázání CO₂ na akceptor – ribulosa-1,5-bisfosfát, na každou fixovanou molekulu CO₂ vznikají 2 molekuly 3-fosfoglycerátu)

U C3 rostlin tvoří tento enzym až 50 % proteinů přítomných v listu, je považován za nejrozšířenější protein v biosféře (Leegood *et al.*, 2000; Raines and Lloyd 2007). Přestože ročně reaguje s 15 % atmosférického CO₂, je považován za pomalý a neúčinný enzym (Griffiths, 2006), především díky malé afinitě k substrátu a nízkému číslu obratu. Jsou popsány 2 strukturní typy: třída I a třída II. Třída I je dále dělena na dva typy: R-typ *Rhodophyt* a G-typ *Chlorophyt*, vzniklé patrně duplikací genů během fylogeneze (Martin and Schnarrenberger, 1997). Vyšší rostliny používají enzym třídy I typ G. Enzymy třídy I mají molekulovou hmotnost 560 kDa, jsou tvořeny osmi velkými a osmi malými podjednotkami. Malé podjednotky jsou kódovány jadernou DNA – rodinou genů, velké podjednotky jsou kódovány DNA chloroplastu – jedním genem. Třída II je s třídou I identická v 30 % primární struktury, enzymy této třídy jsou složeny pouze z velkých podjednotek, jejichž počet se pohybuje od 2 do 6. Třída II byla popsána např. u *Dinophyt*, fotosyntetických protist.

První krok aktivace enzymu Rubisco je katalyzován přídatným enzymem Rubisco-aktivásou. Enzym Rubisco-aktivasa je chaperon s ATPasovou aktivitou (Portis, 2002; Raines and Lloyd, 2007), který je regulován thioredoxinem a existuje ve dvou formách s molekulovou hmotností 43 kDa, či 46 kDa, které vznikají různým sestřihem na C konci. Aktivní je ve formě homodimeru. V aktivním stavu musí mít Rubisco ve vazebném místě pro substrát navázán karbamáto-hořečnatý komplex (Griffiths, 2006; Raines and Lloyd, 2007). Hořečnatý ion se zde váže na karbamát, který vznikne navázáním CO₂ na lyzinový zbytek (z něhož byly předtím uvolněny 2 protony) sousedící s katalytickým místem na velké podjednotce enzymu. Karbamáto-hořečnatý komplex nevzniká, je-li ve vazebném místě přítomen inhibitor (např. ribulosa-1,5-bisfosfát, 2-karboxyarabinitol-1-fosfát). Proces karbamylování, neboli změna enzymu Rubisco v aktivní formu, je stimulován vzestupem pH souvisejícím s fotosyntetickými reakcemi.

Při reakci vedoucí ke vzniku kyseliny 3-fosfoglycerové reaguje s CO₂ velká podjednotka enzymu (ε-amino skupina lyzinového zbytku). S komplexem enzymu a CO₂ reaguje substrát, tj. ribulosa 1,5-bisfosfát, za vzniku enediolu, jehož stabilita klesá při vyšší teplotě (30 – 40 °C), s tímto poklesem stability souvisí i nárůst oxygenasové aktivity enzymu Rubisco a rychlosti fotorespirace (Griffiths, 2006). Je odhadováno, že bez oxygenasové aktivity enzymu Rubisco by produktivita fotosyntézy byla o 30-40 % vyšší (Portis, 2002), míra ztrát závisí na okolní teplotě a dostupnosti vody (Long *et al.*, 2006). Další příčinou poklesu účinnosti fotosyntézy v teplotním intervalu 30-35 °C může být nestabilita Rubisco-aktivasy. Odhalilo se, že po transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana* (L.) genem pro teplotně stabilní Rubisco-aktivasu vykazují tyto rostliny zvýšení rychlosti fotosyntézy a zdvojnásobení listové plochy. Takto transformované rostliny jsou schopny udržovat růst a rychlost fotosyntézy i při zvýšení teploty (Raines, 2006).

Při zvýšeném obsahu CO₂ v prostředí se mění poměr mezi karboxylační a oxygenační aktivitou enzymu Rubisco, roste podíl karboxylace, klesá oxygenace a tím je snížena fotorespirace. Za podmínek zvýšeného obsahu CO₂ není Rubisco limitujícím faktorem pro fotosyntézu, rychlost fotosyntézy je omezena schopností regenerace C₃ cyklu, za kterou jsou odpovědné enzymy SBP, TKL, FBA. U transgenních rostlin, které obsahují méně enzymu Rubisco, ale mají naopak zvýšený obsah některého z enzymů regenerační fáze C₃ cyklu, bylo pozorováno, že jsou schopny se lépe vyrovnat nejen se zvýšeným obsahem CO₂, ale i se sníženým obsahem dusíku v půdě než rostliny netransformované (Raines, 2003).

4.1.1.2 3-fosfoglycerátkinasa

EC 2.7.2.3

Katalyzovaná reakce : 3-PGA + ATP → 1,3-BPGA +ADP

(3-fosfoglycerát je fosforylován γ fosfátem ATP, vzniká 1,3-bisfosfoglycerát)

Aktivní enzym je monomer (jako jediný z enzymů Calvinova cyklu) s molekulovou hmotností 44 kDa, existuje chloroplastový a cytosolický izoenzym. Kódován je jaderným genomem. U vyšších rostlin došlo patrně k duplikaci genů, kopie určená pro chloroplasty kóduje i transitní peptid (Martin *et al.*, 2000; Martin and Schnarrenberger, 1997). Během studia chloroplastového izoenzymu pšenice byla odhalena malá konzervativnost polohy intronů mezi různými organismy (Jones *et al.*, 1995). U genu pro chloroplastový izoenzym pšenice bylo odhaleno 5 intronů (jejich velikost se pohybuje od 77 do 575 bp). V upstream oblasti genu pšenice byl hledán motiv, který je pravděpodobně zodpovědný za regulaci

transkripce, a který byl nalezen i u jiných rostlinných druhů. Na pozici 521 je sekvence CACGTG, která byla zjištěna např. u několika dalších dvouděložných. Motiv GATAAG na pozici 940 genu pro PGK byl nalezen jako upstream část genu kódujícího malou podjednotku Rubisco u mnohých dvouděložných (Gilmartin *et al.*, 1990).

4.1.1.3 Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa

EC 1.2.1.13

Katalyzovaná reakce : $1,3\text{-BPGA} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{GA-3-P} + \text{NADP}^+ + \text{P}_i$

(1,3-bisfosfoglycerát je redukován za spotřeby NADPH, vzniká glyceraldehyd-3-fosfát)

Enzym je aktivní s NAD(H) i NADP(H) (který je preferován), u vyšších rostlin se častěji vyskytuje jako heterotetramer než homotetramer (Conley *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2000). Chloroplastový izoenzym je kódován v jádře a je pravděpodobně eubakteriálního původu (Donath *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 2000), jeho podjednotku A kóduje gen GapA, podjednotku B gen Gapb (Conley *et al.*, 1994). Cytosolický izoenzym je kódován geny (např. GapC) pocházejícími z mitochondriálního genomu endosymbiotického organismu (získány tedy pravděpodobně horizontálním přenosem) (Bringloe *et al.*, 1996). U eukaryot je přítomna třída I, která je identická z 15 – 20 % s archebakteriální třídou II (Martin *et al.*, 2000). U kukuřice se během studia exprese genu kódujícího tento enzym zjistilo, že důležité jsou i introny. Obecně platí, že u jednoděložných i dvouděložných rostlin introny zvyšují expresi genů. U kukuřice kóduje podjednotku A enzymu GAPDH gen GapA1. První dva introny genu jsou lokalizovány v oblasti kódující transiitní peptid, v transformovaných buňkách bez intronů je GapA1 exprimován velmi slabě (Donath *et al.*, 1995). U *Arabidopsis thaliana* (L.) prodlužuje trvání vysoké úrovně exprese vystavení rostlin (předtím pěstovaných ve tmě, či etiolovaných semenáčků) stálému modrému, červenému a bílému záření (účinek červeného záření je menší než u bílého či modrého záření) (Conley *et al.*, 1994). Krátký světelný puls však indukuje přechodný nárůst hladiny mRNA GapA i GapB pouze u etiolovaných semenáčků, nemá vliv na nedospělé rostliny pěstované předtím ve tmě. Deleční analýzy určily dvě oblasti, které jsou důležité pro regulaci exprese GapA světlem, jde o upstream oblast -1045 až -808 (snížení exprese při delecí této oblasti je 31-15krát), -359 až -110 (při delecí je úroveň exprese nízká, mizí rozdíl v expresi GapA mezi rostlinami pěstovanými na světle a ve tmě). Oblast -359 až -110 obsahuje tři kopie dekamerní sekvence 5'CAATGAA(G/A)A3', delece kopie této sekvence lokalizované nejdále proti směru genové exprese způsobí pokles pozitivního vlivu záření 13-6krát (Conley *et al.*, 1994).

4.1.1.4 Triosafosfátizomerasa

EC 5.3.1.1

Katalyzovaná reakce : GA-3-P ↔ DHAP

(vratná izomerace glyceraldehdu-3-fosfátu na dihydroxyacetonfosfát)

Enzym se vyskytuje v podobě homodimeru. U vyšších rostlin je kódován geny vzniklými duplikací jaderného genu eukaryot pro cytosolický izoenzym (Martin *et al.*, 2000). Mutanti ječmene řady *albostrians* mají výrazně sníženou aktivitu enzymu TPI. Aktivita enzymu se neliší u rostlin pěstovaných na světle a tmě, její pokles je způsoben plastidovými mutacemi, v jejichž důsledku neobsahují chloroplasty bílého pletiva ribozomy 70S, což znesnadňuje proteosyntézu (Boldt *et al.*, 1992).

4.1.1.5 Fruktosa-1,6 bisfosfát/sedoheptulosa-1,7-bisfosfát aldolasa

EC 4.1.2.13

Katalyzované reakce : GA-3-P + DHAP → F-1,6-BP + H₂O

(ze dvou triosafosfátů, glyceraldehyd-3-fosfátu a dihydroxyaceton fosfátu vzniká fosforylovaná hexosa, tj. fruktosa-1,6-bisfosfát)

E-4-P + DHAP → Su-1,7-BP + H₂O

(po odštěpení fosfátu v poloze 1 z fruktosa-1,6-bisfosfátu a následné adici glyceraldehyd-3-fosfátu (viz 4.1.1.8) vzniká vedle xylulosa-5-fosfátu erytroza-4-fosfát, který reaguje s dihydroxyacetonfosfátem a vzniká sedmiuhlíkatá sedoheptulosa-1,7-bisfosfát)

Existují dva velmi odlišné typy tohoto enzymu, u vyšších rostlin je přítomna třída I, vyskytující se jako homotetramer (Martin *et al.*, 2000).

4.1.1.6 Fruktosa-1,6-bisfosfatasa

EC 3.1.3.11

Katalyzovaná reakce : F-1,6-BP + H₂O → F-6-P + P_i

(fruktosa-1,6- bisfosfát přeměněna nevratnou hydrolýzou na fruktosa-1-fosfát)

Cytosolický a chloroplastový izoenzym se liší mj. mechanismem regulace (Leegood *et al.*, 2000). Cytosolický je alostericky inhibován adenosinmonofosfátem (AMP) a fruktosa 2,6-bisfosfátem, thioredoxin na jeho aktivitu nemá vliv. Naopak chloroplastová forma enzymu je necitlivá vůči AMP a fruktosa 2,6-bisfosfátu.

4.1.1.7 Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa

EC 3.1.3.37

Katalyzovaná reakce : Su-1,7-BP + H₂O → Su-7-P + P_i

(sedoheptulosa-1,7-bisfosfát hydrolyzována, vzniká sedoheptulosa-7-fosfát)

Existují 2 izoenzymy, jeden je specifický pro fruktosa-1,6-bisfosfát, druhý, který je specifický jednak též pro 1,6-bisfosfát, zároveň ale i pro sedoheptulosa 1,7-bisfosfát, se vyskytuje u vyšších rostlin. Aktivita chloroplastové formy je modulovatelná thioredoxinem f (Nishizawa and Buchanan, 1981).

4.1.1.8 Transketolasa

EC 2.2.1.1

Katalyzované reakce : F-6-P + GA-3-P → E-4-P + Xu-5-P

(2 uhlíkové atomy přeneseny z fruktosa-1-fosfátu na glyceraldehyd-3-fosfát, vytvoří se erytroza-4-fosfát a xylulosa-5-fosfát)

Su-7-P + GA-3-P → R-5-P + Xu-5-P

(vzniklá sedoheptulosa-7-fosfát (viz 4.1.1.7) poskytne 2 uhlíkové atomy glyceraldehyd-3-fosfátu, vzniká ribulosa-5-fosfát a xylulosa-5-fosfát)

Tento enzym je esenciální pro Calvinův cyklus a také oxidativní pentosofosfátovou dráhu. Existuje jako homodimer kódovaný jaderným genem eubakteriálního původu (Martin and Schnarrenberger, 1997).

4.1.1.9 Ribulosa-5-fosfát-3-epimerasa

EC 5.1.3.1

Katalyzovaná reakce : Ru-5-P ↔ Xu-5-P

(ribulosa-5-fosfát přeměněna v xylulosa-5-fosfát, reakce je reverzibilní)

Homodimerní enzym kódovaný jaderným genomem (Martin *et al.*, 2000). Sekvence kódující enzym u *Solanum tuberosum* (L.) je velmi podobná bakteriálním epimerasám (Teige *et al.*, 1995). K hromadění enzymu dochází pouze v zelených pletivech obsahujících chloroplasty.

4.1.1.10 Ribosa-5-fosfátizomerasa

EC 5.3.1.6

Katalyzovaná reakce : R-5-P \leftrightarrow Ru-5-P

(vratná izomerace ribosa-fosfátu v ribulosa-5-fosfát)

U vyšších rostlin zatím nebyla odhalena cytosolická forma tohoto enzymu. V chloroplastech funguje v formě heterodimeru (Martin and Scharrenberger, 1997). Enzym je akumulován jak v zelených, tak i v nezelených orgánech rostlin (Teige *et al.*, 1995).

4.1.1.11 Fosforibulosokinasa

EC 2.7.1.19

Katalyzovaná reakce : Ru-5-P + ATP \rightarrow Ru-1,5-BP + ADP

(γ fosfát ATP se připojí na ribulosa-5-fosfát, vzniká původní substrát enzymu Rubisco, tj. ribulosa-1,5-bisfosfát)

U vyšších rostlin existuje dimerní enzym třídy II (Martin and Schnarrenberger, 1997). Je regulován světlem, ve tmě je v inaktivním oxidovaném stavu. Ke stabilizaci enzymu přispívá ATP, které je pro PRK substrátem, a redukční činidlo dithiotreitol, který je schopen aktivace enzymu (Kamber and Feller, 1998). Na světle se aktivita enzymu výrazně zvýší za přispění thioredoxinu, důležité pro nárůst aktivity jsou dva cysteinové zbytky - Cys16, Cys53 u *Arabidopsis thaliana* (L.) (Horsnell and Raines, 1991), Cys16, Cys55 u špenátu (Kamber and Feller, 1998). Při studiu podobnosti enzymu u různých rostlinných druhů byla zjištěna 90% podobnost primární struktury u pšenice, špenátu a huseníčku, avšak transitní peptidy se svojí strukturou liší (Horsnell and Raines, 1991). Enzym je kódován jaderným genomem (Martin and Schnarrenberger, 1997).

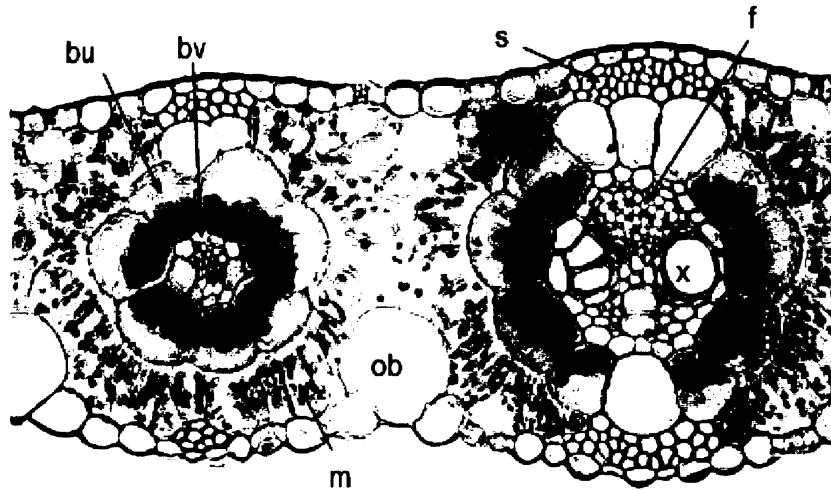
4.2 C4 typ metabolismu

Z odhadovaných 2 500 000 rostlinných druhů vyskytujících se na Zemi se u 7 500 druhů (3 %) vyskytuje C4 typ fotosyntézy (Sage, 2004), který se na celkové primární produkci podílí 20 - 25 %. Předpokládá se, že C4 typ se vyvinul z typu C3, první C4 rostliny se objevily v prvohorách během karbonu. Bylo dokázáno 45 nezávislých vzniků tohoto typu fotosyntetického metabolismu u 19 čeledí vyšších rostlin. Mezi C4 rostlinami převažují rostliny jednoděložné – *Poaceae* (4500 druhů), *Cyperaceae* (1500 druhů), rostliny

dvouděložné tvoří zhruba šestinu druhů (1200 druhů) - četní zástupci jsou v čeledích *Chenopodiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Amaranthaceae*, *Asteraceae* (Sage, 2004; přehled vybraných rostlinných rodů, u nichž byl odhalen C4 typ fotosyntézy, je uveden v Tab. 1). C4 typ metabolismu mají i některé významné plodiny, např. *Zea mays* (L.), *Sorghum* sp., *Panicum* sp., *Saccharum officinarum* (L.).

Přítomnost jiných látek než 3-fosfoglycerátu jako primárního produktu fixace CO₂ byla odhalena poprvé v roce 1954 u některých rostlinných druhů (Hatch, 2002). C4 typ fotosyntézy je soubor reakcí a mechanismů, které soustřeďují CO₂ kolem enzymu Rubisco, k čemuž jsou rostliny anatomicky, fyziologicky i biochemicky přizpůsobeny (Moore, 1994; Ku *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2005). Rostliny C4 mají vyšší hodnotu WUE, obvykle se u nich vyskytuje

tzv. Kranz-anatomie mezofylu (tlustostěnné parenchymatické buňky tvořící věčtý obal cévních svazků) (ale ne vždy, např. *Hydrilla verticillata* (L.f.) (Rao *et al.*, 2006), *Borszczowia aralocaspica* (Bunge), *Bienertia cycloptera* (Bunge ex Boiss.) (Voznesenskaya *et al.*, 2002) mají fotosyntetické reakce soustředěny v jednom typu buněk. Obr. 5 zachycuje průřez listem s Kranz-anatomii. Tento typ fotosyntézy se dále dělí na tři varianty lišící se především specifickou reakcí koncentrující CO₂; tato reakce předchází Calvinův cyklus, který probíhá u C4 rostlin také. Pro všechny tři varianty je však charakteristická přítomnost enzymu fosfoenolpyruvátcarboxylasy, která je lokalizovaná ve vnější mezofylové vrstvě (Ku *et al.*, 1996; Sage, 2004). Rubisco spolu s dalšími enzymy jsou lokalizovány v buňkách pochvy cévních svazků. Reakce katalyzované fosfoenolpyruvátcarboxylasou a enzymem Rubisco jsou tak u C4 rostlin odděleny prostorově, probíhají v buňkách mezofylu a buňkách pochvy cévních svazků.



Obr.5. Příčný řez listem *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. (C4 druh čeledi Poaceae)

bu – buňka vnější vrstvy parenchymatické pochvy cévního svazku, bv – buňka vnitřní vrstvy pochvy, f - floém, m - mezofyl, ob – ohýbací (též motorická) buňka, s - sklerenchym, x – xylém (podle Rudall, 2007, upraveno).

Průběh genové exprese genů pro C4 formy enzymů je specifický podle buněčného typu. Mezofylová exprese je většinou regulována na úrovni transkripce, zatímco exprese v buňkách pochvy cévních svazků je regulována i posttranskripčně (Sheen, 1999).

Enzymy C4 metabolismu se vyskytují i u C3 rostlin. U C3 rostlin jsou součástí jiných metabolických drah a jsou obvykle méně aktivní (Sage, 2004). C4 specifické izoformy se od enzymů rostlin C3 liší kinetickými vlastnostmi, někdy i buněčnou kompartmentací. Během evoluce byly zřejmě modifikovány a tím získaly novou roli v metabolismu. Evoluce C4 typu fotosyntézy probíhala pravděpodobně v několika fázích, během kterých došlo mj. k duplikaci genů, jejímž důsledkem byla ztráta některých funkcí enzymů či získání nových vlastností. Změny vznikaly i mutacemi, crossing-overem, při inserci mobilních elementů. Změny v regulačních cis-elementech vedly ke změně genové exprese a kompartmentace enzymů, mutace v oblasti promotorů způsobily ztrátu exprese (Ku *et al.*, 1996; Sage, 2004).

Tab.1 Přehled vybraných rodů krytosemenných rostlin, u kterých byl odhalen C4 typ fotosyntézy. V tabulce je zachyceno taxonomické zařazení do třídy (Liliopsida - jednoděložné, Rosopsida - pravé dvouděložné) a čeledi. (podle Sage, 2004.)

<i>Liliopsida</i>		<i>Rosopsida</i>	
<i>Poaceae</i>	<i>Andropogon</i>	<i>Acanthaceae</i>	<i>Blepharis</i>
	<i>Antropogon</i>	<i>Aizoceae</i>	<i>Cypselea</i>
	<i>Aristida</i>		<i>Sesuvium</i>
	<i>Axonopus</i>		<i>Trianthema</i>
	<i>Buchloe</i>	<i>Amaranthaceae</i>	<i>Aerva</i>
	<i>Centropodia</i>		<i>Alternanthera</i>
	<i>Cynodon</i>		<i>Amaranthus</i>
	<i>Digitaria</i>		<i>Gomphrena</i>
	<i>Echinochloa</i>	<i>Asteraceae</i>	<i>Flaveria</i>
	<i>Eriachne</i>		<i>Chrysanthellum</i>
	<i>Chloris</i>		<i>Isostigma</i>
	<i>Leptocoryphium</i>		<i>Pectis</i>
	<i>Miscanthus</i>	<i>Boraginaceae</i>	<i>Heliotropium</i>
	<i>Muhlenbergia</i>	<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Polycarpaea</i>
	<i>Ophiochloa</i>	<i>Capparaceae</i>	<i>Cleome</i>
	<i>Panicum</i>	<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Atriplex</i>
	<i>Paspalum</i>		<i>Bassia</i>
	<i>Pheidolochloa</i>		<i>Bienertia</i>
	<i>Saccharum</i>		<i>Borszczowia</i>
	<i>Setaria</i>		<i>Climacoptera.</i>
	<i>Sorghum</i>		<i>Girgensohnia</i>
<i>Stipagrostis</i>		<i>Halosarcia</i>	
<i>Streptostachys</i>		<i>Haloxylon</i>	
<i>Thrasya</i>		<i>Chenolea</i>	
<i>Urochloa</i>		<i>Kochia</i>	
<i>Zea</i>		<i>Noaea</i>	
<i>Zoysia</i>		<i>Ofaiston</i>	
		<i>Salsola</i>	
		<i>Suaeda</i>	
<i>Cyperaceae</i>	<i>Crosslandia</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Chamaesyce</i>
	<i>Cyperus</i>	<i>Gisekiaceae</i>	<i>Gisekia</i>
	<i>Eleocharis</i>	<i>Malvaceae</i>	<i>Gossipium</i>
	<i>Fimbristylis</i>	<i>Molluginaceae</i>	<i>Mollugo</i>
	<i>Kyllinga</i>	<i>Nyctaginaceae</i>	<i>Allionia</i>
	<i>Mariscus</i>		<i>Boerhavia</i>
<i>Rhynchospora</i>		<i>Okenia</i>	
<i>Syntrinema</i>		<i>Polygonaceae</i>	<i>Calligonum</i>
<i>Hydrocharitaceae</i>	<i>Egeria</i>	<i>Portulacaceae</i>	<i>Portulaca</i>
	<i>Hydrilla</i>	<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Anticharis</i>
		<i>Zygophyllaceae</i>	<i>Zygophyllum</i>

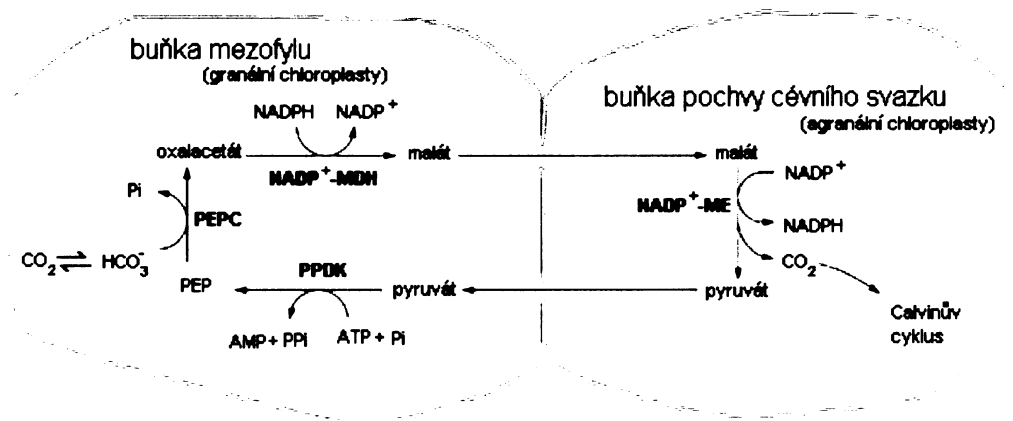
4.2.1 Varianty C4 fotosyntézy

Existují tři podtypy C4 metabolismu, které se liší mechanismem dekarboxylace v buňkách pochvy cévních svazků. Charakteristická je pro ně vždy jen jedna ze tří dekarboxylas: NADP-dependentní jablečný enzym (NADP-ME), NAD-dependentní jablečný

enzym (NAD-ME), či fosfoenolpyruvátkarboxykinasa (PEPCK). Počáteční fixace CO_2 , který je nejprve karbonátdehydratasou hydratován na HCO_3^- , je společná všem podtypům, produktem této fixace je kyselina oxaloctová (Leegood *et al.*, 2000).

4.2.1.1 NADP-ME varianta

Podtyp C4 fotosyntézy, který se vyskytuje u rostlin jednoděložných (např. *Zea mays* (L.), *Saccharum officinarum* (L.), *Sorghum* sp., *Cyperus* sp.) i dvouděložných. V mezofylu je kyselina oxaloctová redukována na malát, ten je následně transportován do buněk pochvy cévních svazků. Po vstupu do chloroplastu je zde dekarboxylován NADP-dependentním jablečným enzymem, vzniká NADPH, pyruvát a CO_2 , který vstupuje do Calvinova cyklu. Pyruvát se po dekarboxylaci vrací do chloroplastu mezofylových buněk, kde je konvertován během reakce s ATP na akceptor CO_2 – fosfoenolpyruvát. Ten je po svém vzniku (který je energeticky velmi náročný) transportován do cytoplazmy. Celý cyklus je zachycen na Obr. 6.



Obr.6. NADP-ME varianta C4 fotosyntézy

AMP - adenosinmonofosfát, ATP - adenosin trifosfát, CO_2 – oxid uhličitý, HCO_3^- - hydrogenuhličitánový anion, NADP^+ - oxidovaný nikotinamidadenin nukleotidfosfát, NADPH – redukovaný nikotinamidadenin nukleotidfosfát, NADP^+ -MDH – NADP-malátdehydrogenasa, NADP^+ -ME – NADP-dependentní jablečný enzym, PEPCK - fosfoenolpyruvátkarboxylasa, PEP - fosfoenolpyruvát, P_i – anorganický fosfát, PP_i – anorganický difosfát, PPDK – pyruvát-fosfát dikinasa.

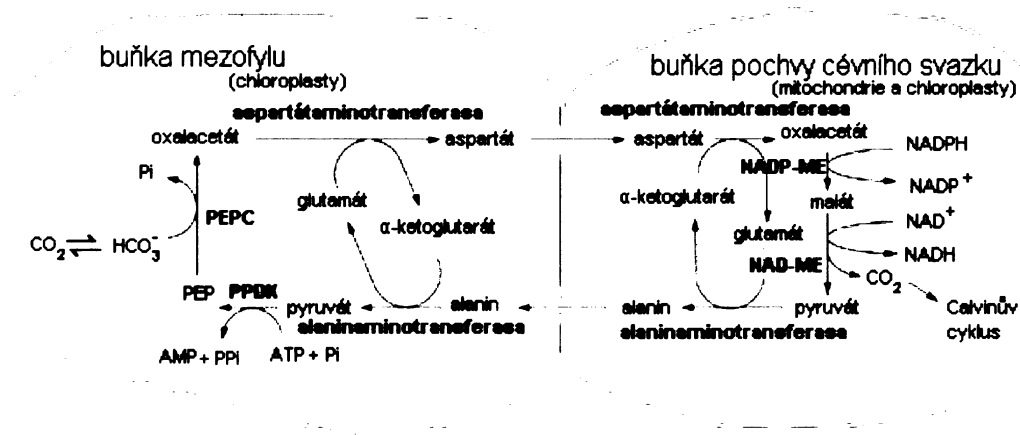
(podle Buchanan *et al.*, 2000, upraveno)

4.2.1.2 NAD-ME varianta

Tímto způsobem fotosyntetizují mnohé druhy trav – např. *Panicum milliacum* (L.) – i dvouděložných rostlin. Rostliny NAD-ME varianty mají v buňkách pochev cévních svazků chloroplasty s grany a hojný počet velkých mitochondrií. Hlavní transportovanou čtyřuhlíkatou kyselinou je zde aspartát, který vzniká transaminací oxalacetátu v cytosolu

mezofylových buněk. Je transportován do buněk pochvy cévních svazků, kde vstupuje do mitochondrií, a v reakci s 2-oxoglutarátem je přeměněn na kyselinu oxaloctovou. Ta je poté s využitím NADPH redukována na malát. Malát je dekarboxylován činností NAD-ME a pyruvát vzniklý touto oxidativní dekarboxylací v mitochondriích je transportován do cytosolu, kde je aminován na alanin. Ten je transportován do buněk mezofylu, jeho aminoskupina je zde použita pro transaminaci oxalacetátu (viz výše). NAD-ME varianta C4 fotosyntézy je zachycena na Obr. 7.

Za jistých podmínek je z buněk mezofylu do buněk pochvy cévních svazků transportován malát. Pyruvát uvolněný po dekarboxylaci malátu se vrací zpět do mezofylu, zde plní úlohu prekursoru regenerace fosfoenolpyruvátu.



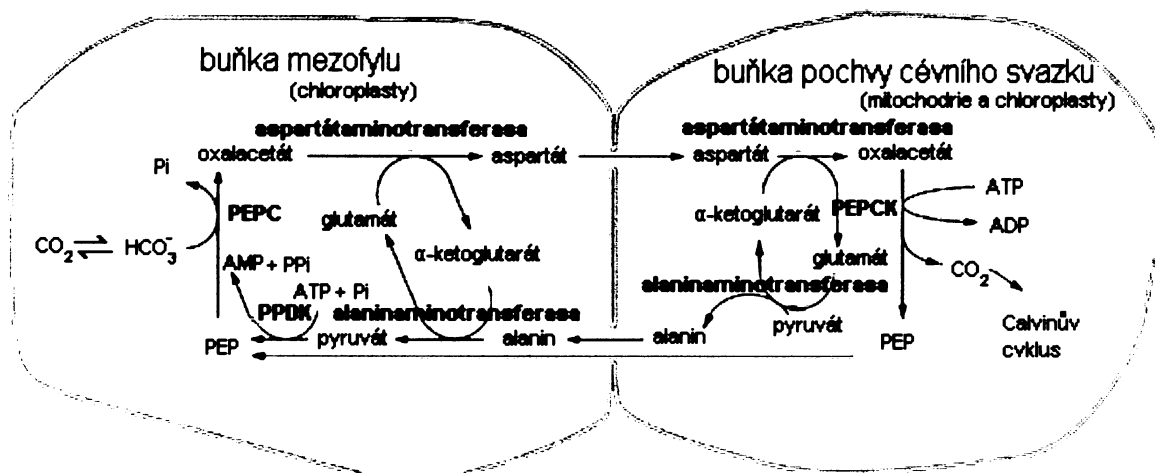
Obr. 7. NAD-ME varianta C4 fotosyntézy

AMP - adenosinmonofosfát, ATP - adenosin trifosfát, CO_2 – oxid uhličitý, HCO_3^- - hydrogenuhličitanový anion, NAD^+ - oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid, $NADH$ – redukovaný nikotinamidadenindinukleotid, NAD-ME – NAD-dependentní jablečný enzym, $NADP^+$ - oxidovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát, $NADPH$ – redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát, NADP-ME – NADP-dependentní jablečný enzym, PEP - fosfoenolpyruvát, PEPC - fosfoenolpyruvátkarboxylasa, P_i – anorganický fosfát, PP_i – anorganický difosfát, PPDK – pyruvát-fosfát dikinasa.
(podle Buchanan et al., 2000, upraveno)

4.2.1.3 PEPCCK varianta

Tato varianta metabolismu C4 byla zatím odhalena pouze u trav čeledi *Poaceae* (např. *Panicum maximum* (Jacq.)). Do buněk pochev cévních svazků je z mezofylu transportován aspartát. Oxalacetát je formován v mitochondriích buněk pochvy cévních svazků deaminací aspartátu, poté je transportován do cytosolu. Fosfoenolpyruvát formovaný

během dekarboxylace kyseliny oxaloctové, je transportován zpět do mezofylu a je zde použit přímo k asimilaci CO₂. PEPCCK variantu C4 fotosyntézy zobrazuje Obr. 8.



Obr. 7. PEPCCK varianta C4 fotosyntézy

AMP - adenosinmonofosfát, ADP - adenosindifosfát, ATP - adenosintrifosfát, CO₂ - oxid uhličitý, HCO₃⁻ - hydrogenuhličitanový anion, PEP - fosfoenolpyruvát, PEPC - fosfoenolpyruvátkarboxylasa, P_i - anorganický fosfát, PP_i - anorganický difosfát, PEPCK - fosfoenolpyruvátkarboxykinasa, PPDK - pyruvát-fosfátkinasa.

(podle Buchanan et al., 2000, upraveno)

4.2.2 Enzymy C4 fotosyntézy

4.2.2.1 Karbonátdehydratasa

EC 4.2.1.1

Katalyzovaná reakce: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$

(CO₂ je hydratován, vzniká anorganická forma uhlíku – hydrogenuhličitan)

Karbonátdehydratasa (též karboanhydrasa) existuje u vyšších rostlin v cytosolické a chloroplastové formě. U C3 rostlin převažuje chloroplastová izoforma, u rostlin C4 je naopak dominantní forma cytosolická. Geny těchto dvou izoforem se patrně vyvinuly v období před fylogenetickým oddělením rostlin jednoděložných a dvouděložných. V cytosolu mezofylových buněk napomáhá tento enzym udržovat rovnováhu atmosférického CO₂ a hydrogenuhličitanu, jeho působením se zvyšuje dostupnost hydrogenuhličitanu pro enzym PEPC a CO₂ pro enzym Rubisco. Rostliny s redukovanou aktivitou karbonátdehydratasy mají vyšší Δ¹³C (hodnota Δ¹³C určuje diskriminaci uhlíku, určuje odchylku od standardního složení izotopů v přírodě) (Cousins et al., 2006). Transformované

rostliny s aktivitou CA menší než 10 % aktivity pozorované u rostlin netransformovaných mají nízkou rychlost asimilace CO₂ a rostou (při běžném parciálním tlaku CO₂ v prostředí) pomalu. Aktivita CA je nezbytná pro průběh C₄ fotosyntézy, je faktorem, který více limituje dvouděložné druhy C₄ rostlin než jednoděložné C₄ rostliny (von Caemmerer, 2004).

4.2.2.2 Fosfoenolpyruvátkarboxylasa

EC 4.1.1.31

Katalyzovaná reakce: $\text{PEP} + \text{HCO}_3 \rightarrow \text{OAA} + \text{P}_i$

(hydrogenuhličitan reaguje s fosfoenolpyruvát, vzniká čtyřuhlíkatá sloučenina, kyselina oxaloctová)

U vyšších rostlin je tento enzym kódován rodinou genů *ppc*. Bylo odhaleno pět genů, které jsou označovány jako C₄ gen, C₃ listový gen a 3 geny non-C₄ (též kořenově specifické) (Sheen, 1999). C₄ gen je u kukuřice lokalizován na chromozomu 9, je vysoce exprimován v listech, naopak jeho exprese je nízká v kořenech a etiolovaných listech (Ku *et al.*, 1996). V regulaci exprese hraje roli vysoké zastoupení bází cytosinu a guaninu (vysoký obsah těchto bází byl pozorován i u jiných vysoce exprimovaných genů trav). C₃ listový gen se u kukuřice nachází na chromozomu 7, je exprimován v zelených i etiolovaných listech, nízkou expresí má v kořenech. Geny non-C₄ jsou u kukuřice v kopiích na chromozomech 4 a 5.

Dosud bylo popsáno více než deset forem enzymu fosfoenolpyruvátkarboxylasa. C₄ izoforma enzymu je 15-30krát aktivnější (s maximální aktivitou při pH = 8) než C₃ izoforma (Furbank *et al.*, 2000). C₄ izoforma je tetramerní, molekulová hmotnost podjednotek je 105 či 109 kDa (N-konec je snadno degradovatelný, proto často z proteinu o původních 109 kDa zbývá protein s molekulovou hmotností 105 kDa). Na N-konci je lokalizováno regulační fosforylovatelné místo (specifický serin - na pozici 15 u kukuřice, na pozici 8 u čiroku) odpovídající za regulaci světlem. K růstu aktivity PEPC dochází u kukuřice po 60-100 minutách po přemístění listů ze tmy na světlo (Furbank *et al.*, 2000).

Genová rodina *pepc* u rodu *Flaveria* je modelem pro studium evoluce C₄ genů (Sheen, 1999). U rostlin rodu *Flaveria* byly odhaleny tři geny pro enzym fosfoenolpyruvátkarboxylasa: *ppcA*, *ppcB*, *ppcC*, které kódují funkce enzymu přítomné u C₃ rostlin. C₄ formu enzymu kóduje gen, který je variantou *ppcA*. Tento gen vznikl pravděpodobně změnami ve 2kbp velkém *cis*-regulačním elementu v promotoru *ppcA* (Ku *et al.*, 1996) transkripce tím byla zvýšena. Další změna byla v kódující oblasti genu, kde byl zaměněn alanin za serin na pozici 774. Záměny v oblasti 296-427 způsobily změnu citlivosti

ke glukosa-6-fosfátu. Důsledkem výše uvedených změn byla jiná citlivost C4 formy enzymu k malátu a jiná hodnota k_m pro fosfoenolpyruvát.

4.2.2.3 Pyruvát-fosfátdikinasa

EC 2.7.9.1

Katalyzovaná reakce: pyruvát + P_i + ATP \leftrightarrow PEP + PP_i + AMP

(β a γ fosfáty z ATP jsou přeneseny na dva substráty, pyruvát a anorganický fosfát, vzniká fosfoenolpyruvát, difosfát a adenosinmonofosfát)

Rostlinný enzym je homotetramer (bakteriální je homodimerní), molekulová hmotnost podjednotek má hodnotu 94 kDa (Furbank *et al.*, 2000). Primární struktury enzymu jsou u vyšších i nižších rostlin velmi podobné, liší se transitním peptidem, který je pouze u vyšších rostlin. Předchůdce C3 a C4 forem tohoto genu existoval už před divergencí prokaryot a eukaryot. C4 specifický gen pro enzym pyruvát-fosfátdikinasa je transkribován ze dvou promotorů, existují tedy dvě iniciační místa a produkují se dvě mRNA. Existují dvě izoformy enzymu, cytosolická a chloroplastová. Chloroplastová je exprimována podle delší mRNA, exprese je vysoká v mezofylových buňkách, produkt translace nese tranzitní sekvence. Menší mRNA vede k produktu bez tranzitního peptidu, proto výsledný protein zůstává lokalizován v cytosolu. Vliv světla na obě izoformy enzymu pyruvát-fosfátdikinasa je odlišný; u C3 rostlin indukuje expresi chloroplastové formy (shodně jako u C4 rostlin, ale v nižší míře), u dvouděložné C4 rostliny *Flaveria trinervia* (Spreng.) je za světla hromaděna izoforma chloroplastová, exprese cytosolické izoformy je naopak světlem tlumena. Největší rozdíl mezi C3 a C4 formou enzymu je v síle prvního promotoru, u C3 rostlin je hladina exprese genu pro tento nízká (Sheen, 1999).

C4Pdk gen kukuřice sdílí většinu své kódující sekvence s ancestrálním genem *c_yPdk* kódující cytosolickou formu enzymu. Promotor *c_yPdk* je lokalizován v prvním intronu genu *C4Pdk* a je aktivní ve všech typech orgánů. Promotor *C4Pdk* vede k listové specifitě exprese a světlem ovlivnitelné transkripci v buňkách listového mezofylu, existují domněnky, že promotor *C4Pdk*, který splňuje potřeby C4 genů, vznikl díky rekombinaci repetitivní sekvence, jejímž výsledkem byl vznik nového intronu a připojení tranzitního peptidu (Sheen, 1999).

4.2.2.4 NADP-malátdehydrogenasa

EC 1.1.1.37

Katalyzovaná reakce: $\text{OAA} + \text{NADPH} \leftrightarrow \text{malát} + \text{NADP}$

(redukce kyseliny oxaloctové na malát, přičemž je využito NADPH z primární fáze fotosyntézy)

C4 forma enzymu NADP-malátdehydrogenasa je 10-20krát aktivnější než tento enzym u C3 rostlin. Enzym je za tmy inaktivován, aktivita se mění při ozáření odpovídající 40 % (a menší) plného slunečního svitu. Úplná inaktivace, která je důsledkem oxidace dithiolových skupin (kukuřice a čirok mají v každé podjednotce enzymu osm cysteinových zbytků), může zabránit plynutí NADPH při neúčinné přeměně kyseliny oxaloctové na malát. Roli při aktivaci a inaktivaci hraje i poměr NADPH ku NADP, hladina CO_2 a hladina O_2 (Furbank *et al.*, 2000).

4.2.2.5 NADP-dependentní jablečný enzym

EC 1.1.1.40

Katalyzovaná reakce: $\text{malát} + \text{NADP} \leftrightarrow \text{pyruvát} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$

(oxidativní dekarboxylace malátu na pyruvát)

C4 izoforma tohoto enzymu má vyšší aktivitu, je obzvláště důležitá pro jednoděložné rostliny, které nemají v buňkách pochvy cévních svazků fotosystém II – aktivita enzymu je zde přinejmenším 25krát vyšší než u jiných C4 a C3 rostlin (Furbank *et al.*, 2000). U většiny C3 rostlin se vyskytují tři formy: jedna cytosolická a dvě chloroplastové. Cytosolická forma (72 kDa) převažuje u C3 rostlin, chloroplastové formy mají molekulové hmotnosti 62 kDa a 64 kDa, větší z nich převažuje u C4 rostlin. Gen pro tuto izoformu vznikl duplikací ancestrálního genu a následnou modifikací promotoru. Během studií rodu *Flaveria* (jediný rod čeledi *Asteraceae*, který obsahuje vedle C3 a C4 druhů i přechodné C3-C4 druhy) byly odhaleny dva geny pro chloroplastové izoformy (označeny *Me1*, *Me2*), které jsou si velmi podobné, pravděpodobně vznikly genovou duplikací poměrně nedávno. *Me1* byl nalezen u sedmi druhů rodu *Flaveria*, u C4 druhu *Flaveria bidentis* se exprimuje pouze v listech - je zde regulován světlem. Exprese genu *Me1* je vysoká u *Flaveria bidentis* (L.), *Flaveria trinervia* (Spreng.), u C3-C4 přechodných druhů se gen exprimuje v míře odpovídající stupni C4 fotosyntézy (Marshall *et al.*, 1996). *Me2* byl odhalen v kořenu *Flaveria bidentis* (L.), jeho exprese probíhá ve fotosyntetických i nefotosyntetických pletivech, ale její úroveň je nízká.

4.2.2.6 NAD-dependentní jablečný enzym

EC 1.1.1.38

Katalyzovaná reakce: malát + NAD \leftrightarrow pyruvát + CO₂ + NADH

(oxidativní dekarboxylace malátu, vzniká pyruvát a CO₂)

U C₄ rostlin se NAD-dependentní jablečný enzym vyskytuje ve formě oktameru, C₄ forma má 18-60krát vyšší aktivitu než enzym C₃ rostlin (Furbank *et al.*, 2000).

4.2.2.7 Fosfoenolpyruvátkarboxykinasa

EC 4.1.1.49

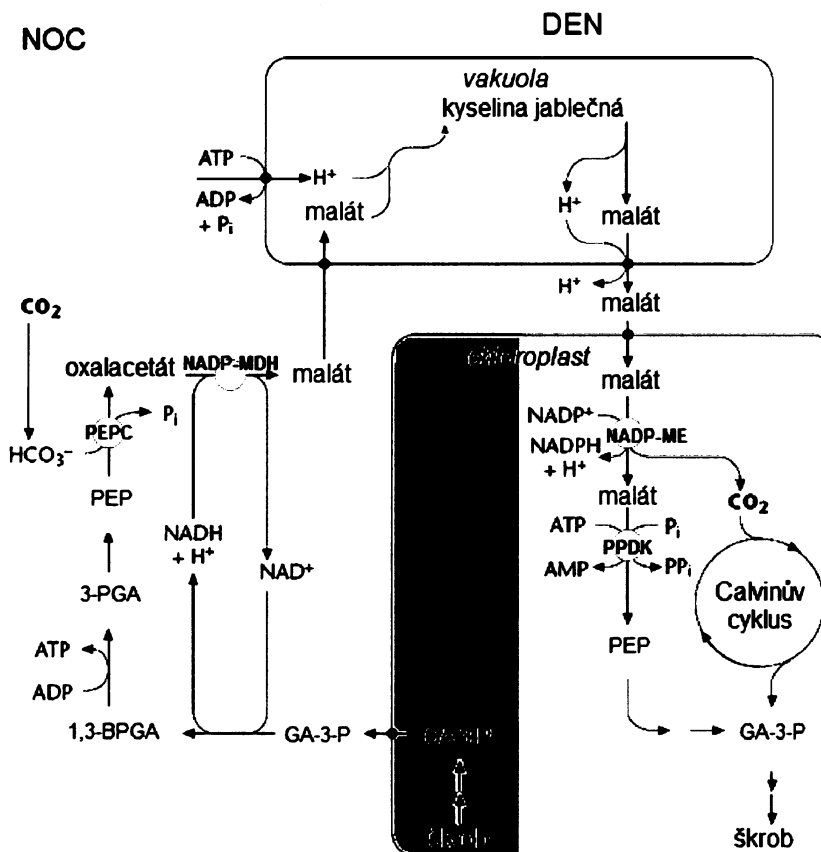
Katalyzovaná reakce: OAA + ATP \rightarrow PEP + ADP

(dekarboxylace oxalacetátu na fosfoenolpyruvát, reakce je závislá na energii ATP)

Enzym je lokalizovaný v cytosolu buněk pochev cévních svazků, má podobu hexameru, s molekulovou hmotností jednotlivých podjednotek 64 kDa (Leegood *et al.*, 2000). Je hlavní dekarboxylasou skupiny rostlin PEPCCK varianty. Tento enzym je kódován kódován genovou rodinou *pck*. Zatím byly odhaleny čtyři geny této rodiny: *pck1*, *pck2*, *pck3*, *pck4*. Během studia fotosyntézy u druhu *Urochloa panicoides* (Beauv.) bylo zjištěno, že v listech převažují transkripty genů *pck1* a *pck2*, naopak v kořeni jsou exprimovány především geny *pck3* s *pck4*. Geny *pck1* a *pck2* jsou z 96 % identické (Finnegan *et al.*, 1999).

4.3 CAM typ metabolismu

Crassulacean acid metabolism (zkratkou CAM) je třetí varianta fotosyntézy, která využívá enzymy Calvinova cyklu i enzymy C₄ cesty asimilace CO₂. Procesy C₃ a C₄ asimilace probíhají časově odděleně: fixace C₄ za tmy, cyklus C₃ za světla (existují i druhy CAM rostlin fixující CO₂ 24 hodin denně, příkladem je *Tillandsia usneoides* (L.)) (Cushman and Bohnert, 1999; Dodd *et al.*, 2002). Schéma CAM typu fotosyntézy je uvedeno na Obr. 9. Existují i další znaky, které charakterizují fixační cestu CAM.



Obr.9. CAM typ fotosyntézy. Zachycen stav ve dne (za světla) a v noci (ve tmě).

1,3-BPGA – 1,3-bisfosfoglycerát, 3-PGA – 3-fosfoglycerát, ADP – adenosindifosfát,

AMP – adenosinmonofosfát, ATP – adenosintrifosfát, CO₂ – oxid uhličitý, H⁺ - proton, HCO₃⁻ -

hydrogenuhlíčitánový anion, GA-3-P – glyceralddehyd-3-fosfát, NAD⁺ - oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid, NADH – redukovaný nikotinamidadenindinukleotid, NADP-MDH – NADP-dependentní malátdehydrogenasa,

NADP-ME– NADP-dependentní jablečný enzym, PEP - fosfoenolpyruvát, PEPC - fosfoenolpyruvátkarboxylasa,

P_i – anorganický fosfát, PP_i – anorganický difosfát, PDK - pyruvátfosfátkinasa.

(podle Portis, 2004, Šetlík a kol., Fyziologie rostlin,

dostupné na <http://www.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/fyzros.html> . upraveno)

Primární karboxylace, katalyzovaná enzymem PEPC, probíhá výhradně v noci a její substrát, fosfoenolpyruvát, je doplňován z procesů metabolismu škrobu (u CAM rostlin není fosfoenolpyruvát získáván z dekarboxylace, která u C₃ a C₄ rostlin probíhá současně s karboxylací). Typické pro CAM rostliny je i hromadění malátu ve vakuolách během noci (velké vakuoly v buňkách mezofylu jsou anatomickým znakem CAM rostlin). Malát vzniká z oxalacetátu, jeho koncentrace může být až 0,3M, pH vakuolární šťávy klesá až k hodnotě 4 (Portis, 2002). Za světla je malát dopraven do cytosolu, zde je dekarboxylován, při dekarboxylaci je uvolněn CO₂. Uvolněný CO₂ vstupuje do Calvinova cyklu. Calvinův cyklus probíhá i přes přítomnost PEPC a dekarboxylasy v cytosolu. Stejně jako u C₄ typu fotosyntézy

je i u CAM rostlin potlačena fotorespirace díky vysokým koncentracím uvolněného CO₂, při kterých probíhá Calvinův cyklus.

Ke vzniku CAM metabolismu z C3 došlo v období třetihor – v miocénu, jednalo se pravděpodobně o následek snížení obsahu atmosférického CO₂ a kolonizace nových prostředí – suchých habitatů – rostlinami. Tato varianta fotosyntetického metabolismu se považuje za adaptaci na sucho (Cushman and Bohnert, 1999; Dodd *et al.*, 2002), vyskytuje se u nahosemenných, krytosemenných jednoděložných i dvouděložných rostlin, zhruba u 300 rodů 30 čeledí; u rostlin vodních i terestrických, různého vzhledu i životních forem. Velké množství CAM druhů bylo odhaleno mezi tropickými epifytickými kapradinami, dále v čeledích *Agavaceae*, *Bromeliaceae*, *Crassulaceae*, *Cactaceae*, *Orchidaceae*, *Piperaceae*, *Liliaceae* (Luttge, 2004). Název - Crassulacean acid metabolism - je odvozen od čeledi *Crassulaceae*, u které byl tento typ metabolismu poprvé zaznamenán. Pouze některé čeledi mají téměř všechny druhy typu CAM - *Crassulaceae*, *Cactaceae*, *Mesembryanthemaceae*, v ostatních čeledích vykazují CAM metabolismus a sukulenci pouze některé druhy. Známé CAM rody rostlin jsou shrnuty v Tab. 2.

Tab.2 CAM rody krytosemenných i výtrusných rostlin s určením do třídy a čeledi. Ne všechny druhy daného rodu provozují CAM typ fotosyntézy.
(podle <http://wikipedia.org>, 12.7.2008; Cowling et al., 1999; Phillips and Comus, 1999; Keeley, 2003.)

<i>Liliopsida</i>	
<i>Agavaceae</i>	<i>Agave</i> <i>Dracaena</i> <i>Hesperaloe</i> <i>Yucca</i>
<i>Alismataceae</i>	<i>Saggitaria</i>
<i>Apiaceae</i>	<i>Lilaeopsis</i>
<i>Araceae</i>	<i>Zamioculcas</i>
<i>Asclepiadaceae</i>	<i>Adenium</i> <i>Akocanthera)</i> <i>Caralluma</i> <i>Carissa</i> <i>Ceropegia</i> <i>Dischidia</i> <i>Frerea</i> <i>Hoya</i> <i>Huernia</i> <i>Stapelia</i>
<i>Asphodelaceae</i>	<i>Aloe</i> <i>Gasteria</i> <i>Haworthia</i>
<i>Bromeliaceae</i>	<i>Aechmea</i> <i>Ananas</i> <i>Puya</i> <i>Dyckia</i> <i>Hechtia</i> <i>Tillandsia</i>
<i>Commelinaceae</i>	<i>Callisia</i> <i>Tradescantia</i> <i>Tripogandra</i>
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Ipomaea</i>
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Xerosicyos</i> <i>Dendrosicyos</i> <i>Momordica</i>
<i>Cyperaceae</i>	<i>Eleocharis</i> <i>Scirpus</i>
<i>Geraniaceae</i>	<i>Pelargonium</i>
<i>Gesneriaceae</i>	<i>Codonanthe</i>
<i>Hydrocharitaceae</i>	<i>Hydrilla</i>
<i>Lamiaceae</i>	<i>Vallisneria</i> <i>Plectranthus</i>
<i>Moringaceae</i>	<i>Soleus</i> <i>Moringa</i>
<i>Orchidaceae</i>	<i>Vanilla planifolia</i>
<i>Rubiaceae</i>	<i>Hydnophytum</i>
<i>Zygophyllaceae</i>	<i>Myrmecodia</i> <i>Zygophyllum</i>

<i>Rosopsida</i>	
<i>Aizoaceae</i>	<i>Mesembryathenum</i>
<i>Apocynaceae</i>	<i>Adenium</i>
<i>Asteraceae</i>	<i>Senecio</i>
<i>Cactaceae</i>	<i>Opuntia</i> <i>Peniocereus</i> <i>Stenocereus</i>
<i>Clusiaceae</i>	<i>Clusia</i>
<i>Crassulaceae</i>	<i>Crassula</i> <i>Dudleya</i> <i>Graptopetalum</i> <i>Kalanchoe blossfeldiana</i> <i>Sempervivum</i>
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Jatropha</i>
<i>Portulacaceae</i>	<i>Ceraria</i> <i>Portulaca</i>
<i>Sapindaceae</i>	<i>Dodonaea</i> <i>Sesuvium</i>
<i>Vitaceae</i>	<i>Cissus</i> <i>Cyphostemma</i>

<i>Magnoliopsida</i>	
<i>Piperaceae</i>	<i>Peperomia</i>

<i>Lycopodiopsida</i>	
<i>Isoetaceae</i>	<i>Isoetes</i>

<i>Polypodiopsida</i>	
<i>Polypodiaceae</i>	<i>Drymoglossum</i> <i>Microsorium</i> <i>Platyserium</i> <i>Polypodium</i>

<i>Pteridopsida</i>	
<i>Vittariaceae</i>	<i>Vittaria</i>

<i>Cycadopsida</i>	
<i>Zamiaceae</i>	<i>Dioon</i>

<i>Gnetopsida</i>	
<i>Welwitschiaceae</i>	<i>Welwitschia</i>

Vedle rostlin, které jsou CAM-konstitutivní (tj. jiný typ fotosyntetické fixace CO₂ než CAM neprovozují), existuje mnoho rostlinných druhů, které jsou CAM-obligátní (stávají se CAM rostlinami až po změně podmínek prostředí – obvykle v reakci na stres suchem) - a mají velkou plasticitu exprese CAM genů. Přechod na CAM probíhá u sukulentů schopných měnit

fixační cestu CO₂ za vysokých teplot, dále při nedostatku vody v půdě, kdy se omezení transpirace stává výhodou. Omezení transpirace vedoucí k omezenému příjmu solí je výhodné i při zasolení půdy. Plasticita genové exprese je zřejmá u čeledi *Crassulaceae*, její druhy s tenčími listy jsou za podmínek stálé koncentrace CO₂ rostlinami C₃, naopak druhy silnolisté (více šťavnaté) trpí limitací difúze CO₂ a soustřeďují se na fixaci CO₂ v noci, tím se zásobí uhlíkem pro denní potřebu (Dodd *et al.*, 2002). Rostliny rodu *Kalanchoe* sp. mohou být (stejně jako rod *Mesembryanthemum* sp.) přechodného typu C₃/CAM, či alespoň jejich nejmladší listy fotosyntetizují C₃ způsobem (Luttge, 2004). Jako „CAM cycling“ se označuje fotosyntetický metabolismus u rostlin s málo zřetelným CAM, které se jeví jako C₃ rostliny, tyto rostliny se vyskytují na habitatech s nepředpověditelnou zásobou vody.

CAM rostliny se rozdělují do dvou skupin, ME typ a PEPCK typ. Toto dělení je založeno na typu enzymu, který dekarboxyluje čtyřuhlíkaté kyseliny. Často platí, že druhy jedné čeledi patří ke shodnému typu CAM, pro vyšší taxony to neplatí (Cushman and Bohnert, 1999).

Při ME typu CAM metabolismu je dekarboxylován malát buď v cytosolu či v mitochondriích za využití NADP-ME či NAD-ME, při dekarboxylaci je uvolněn CO₂ a pyruvát. Pyruvát je přeměněn v chloroplastu ve fosfoenolpyruvát enzymem PPK. U ME typu CAM není aktivní enzym PEPCK.

Naopak při PEPCK typu CAM metabolismu rostliny postrádají aktivitu PPK. Kyselina oxaloctová v tomto případě vzniká činností NAD(P)H-MDH, je enzymem PEPCK v cytosolu změněna na fosfoenolpyruvát a CO₂. Enzym ME je u PEPCK typu CAM méně aktivní než u ME typu CAM.

Tradičně se CAM metabolismus popisuje čtyřfázovým schématem (fáze jsou vymezeny obdobími dne o určité ozářenosti – noc, úsvit, den, stmívání), jednotlivé fáze byly definovány na základě změn koncentrace malátu v listech. 1. fáze probíhá v noci. Atmosférický či respirační vzniklý CO₂ je fixován v cytosolu fosfoenolpyruvátkarboxylasou, substrátem pro tuto fixaci je fosfoenolpyruvát vytvořený během předchozího dne. Noční fáze metabolismu představuje kontrolní bod CAM dráhy, dochází při ní k ukládání uhlíku. Vznikající kyselina jablečná je skladována v centrální vakuole. Během 2. fáze, za úsvitu, dochází k přepnutí C₄ dekarboxylace na C₃, fosfoenolpyruvátkarboxylasa je deaktivována defosforylací. Ve 3. fázi, během dne, probíhá dekarboxylace malátu jedním či kombinací několika z těchto enzymů: NADP-ME, NAD-ME, PEPCK (viz výše). Při stmívání, ve 4. fázi, která je podobně jako 2. fáze přechodnou, je dekarboxylace ukončena, otevírají se průduchy a je zahájena fixace CO₂ způsobem C₃ (Luttge, 2004; Dodd *et al.*, 2002).

Energetické náklady na fixaci jedné molekuly CO₂ jsou větší než u rostlin C₄; 1-2 molekuly ATP jsou spotřebovány při zpracovávání malátu, navíc je 1 molekula ATP potřebná k transportu jedné molekuly malátu do vakuoly a 0,5 molekuly ATP se využije na syntézu zásobních sacharidů (Dodd *et al.*, 2002).

4.3.1 Klíčové enzymy CAM fotosyntézy

Správné fungování a časová posloupnost fixační cesty CAM je dáno přesnou regulací aktivity enzymů. Všechny mechanismy regulace zatím nebyly objasněny. Během indukce CAM metabolismu je indukována exprese genů pro CAM-specifické enzymy. Předmětem studia jsou v současnosti CAM geny, genové rodiny, regulace indukce jejich exprese a průběh této exprese. Stupeň aktivace CAM specifických genů závisí na typu a míře stresu, stejně jako na vývojovém stadiu rostliny. Po zasolení půdy nebo dehydrataci dochází ke hromadění mRNA CAM-specifických genů, což bylo pozorováno např. u rostlin *Mesembryathenum crystallinum* (L.), *Kalanchoe blossfeldiana* (Poelln.). Při přechodu z C₃ na CAM typ metabolismu v důsledku zasolení půdy u druhu *Mesembryathenum crystallinum* (L.) vzrůstá rychlost transkripce více než šestkrát (Vernon and Bohnert, 1992). Regulace exprese probíhá transkripčně i posttranskripčně, translačně i posttranslačně. Transkripční aktivaci CAM genů zprostředkovává interakce *cis*-aktivační sekvence DNA s *trans*-aktivačními faktory. Posttranskripční regulaci představuje nárůst množství RNA-vazebných proteinů stabilizujících mRNA v chloroplastech. Translační regulace u indukce přechodu z metabolismu C₃ k CAM je vyjádřena poklesem celkové proteosyntézy doprovázejícím indukcí CAM, ale zároveň roste množství CAM-specifických enzymů. Posttranslační regulace PEPC slouží k omezení zbytečných cyklů karboxylace a dekarboxylace (Cushman and Bohnert, 1999).

4.3.1.1 Fosfoenolpyruvátkarboxylasa

EC 4.1.1.31

Katalyzovaná reakce: fosfát + OAA → H₂O + PEP + CO₂

U druhů *Mesembryathenum crystallinum* (L.), *Kalanchoe blossfeldiana* (Poelln.), *Vanilla planifolia* (Jacks.) bylo zjištěno, že malá genová rodina kódující enzym PEPC má až čtyři členy – *Ppc1* až *Ppc4*. CAM-specifická izoforma enzymu je ve zvýšené míře produkována v listech, zbylé izoformy jsou v malé míře přítomny v pletivech s CAM

metabolismem (tyto izoformy plní roli anaplerotických „housekeeping“ či pletivově-specifických proteinů). Aktivita PEPC je pozitivně alostericky ovlivněna glukosa-6-fosfátem, triosafosfátem, negativní vliv na enzym má L-malát. PEPC podléhá vratné fosforylaci enzymem PEPCK, fosforylují se přitom serinové zbytky lokalizované na N-koncové doméně (Nimmo, 2000).

U rostlin CAM se enzym PEPC vyskytuje ve dvou reversibilních formách. Za tmy je ve formě aktivní, která má vyšší afinitu k PEP a je více citlivá ke glukosa-6-fosfátu, triosafosfátu, méně citlivá k L-malátu. Defosforylovaná forma vyskytující se ve dne je citlivější na inhibici malátem (Dodd *et al.*, 2002).

4.3.1.2 NADP-malát dehydrogenasa, NAD-malátdehydrogenasa

EC 1.1.1.37

Katalyzovaná reakce: OAA + NADPH \leftrightarrow malát + NADP

(oxalacetát je redukován na malát)

NADP-MDH je lokalizována v chloroplastech a kódována genem *Mdh1*. NAD-MDH kóduje gen *Mdh2*, enzym je lokalizován v cytoplasmě (Cushman *et al.*, 2000).

4.3.1.3 NADP dependentní jablečný enzym

EC 1.1.1.40

Katalyzovaná reakce: malát + NADP \leftrightarrow pyruvát + CO₂ + NADPH

(oxidativní dekarboxylace malátu na pyruvát)

U druhu *Mesembryathenum crystallinum* (L.) byla odhalena multigenní rodina pro tento enzym s nejméně jedním CAM-specifickým izogenem *Mod1* (Cushman and Bohnert, 1999). Enzym je lokalizován v cytoplasmě.

4.3.1.4 Pyruvátfosfát dikinasa

EC 2.7.9.1

Katalyzovaná reakce: pyruvát + P_i + ATP \leftrightarrow PEP + PP_i + AMP

(β a γ fosfáty z ATP přeneseny na dva substráty, pyruvát a anorganický fosfát, vzniká fosfoenolpyruvát, difosfát a adenosinmonofosfát)

Enzym PPKK je lokalizován v chloroplastech, u *Mesembryanthemum crystallinum* (L.) byl odhalen gen *Ppdk1* kódující tento enzym (Cushman and Bohnert, 1999).

4.3.1.5 Fosfoenolpyruvátkarboxykinasa

EC 4.1.1.49

Katalyzovaná reakce: $OAA + ATP \rightarrow PEP + ADP$

(oxalacetát je dekarboxylován, vzniká fosfoenolpyruvát, při reakci se spotřebovává energie ATP)

Enzym je zhruba dvacetkrát hojnější v noci než během dne. PEPCK je fosforylována v noci a defosforylována ve dne. Enzym je lokalizován v cytoplasmě (Cushman *et al.*, 2000). Díky buněčně-specifické distribuci enzymu v listech bylo u druhu *Clusia apipoensis* (L.), u které se projevuje CAM metabolismus slabě, odhaleno, že enzym může být kódován více než jedním genem (Borland *et al.*, 1998).

5 Závěr

Během evoluce se u rostlin vyvinuly různé varianty sekundární fáze fotosyntézy – C3, C4 a CAM. Ke Calvinovu cyklu fixace CO₂ přibyly další reakce, které (výměnou za vyšší spotřebu ATP) zajišťují vyšší koncentraci CO₂ v okolí enzymu Rubisco. U C4 a CAM rostlin jsou zároveň omezeny ztráty vody způsobené transpirací. Jednotlivé enzymy jsou kódovány jaderným genomem, chloroplastová DNA kóduje pouze velké podjednotky Rubisco. Poznatky o tom, jak se liší geny enzymů podle typu fotosyntézy, pocházejí z výzkumu prováděném na několika málo rostlinných druzích, zatím je nelze brát za obecně platné. Bude potřeba ještě celá řada srovnání C3, C4, CAM rostlin, rostlin přechodného typu C3-C4 i rostlin transgenních k tomu, abychom lépe pochopili, co vede na úrovni struktury genů, regulace jejich exprese i regulace celých metabolických drah k rozdílům mezi různými typy fotosyntetického metabolismu zejména při reakci rostlin na různé podmínky prostředí (mj. dostupnost vody, zasolení, ozáření).

6 Literatura

- Boldt R, Borner T, Schnarrenberger C (1992) Repression of the plastidic isoenzymes of aldolase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase in the barley mutant "albostrians". *Plant Physiol* 99: 895-900.
- Borland AM, Técsi LI, Leegood RC, Walker RP (1998) Inducibility of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia* species; physiological/biochemical characterisation and intercellular localization of carboxylation and decarboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. *Planta* 205: 342-351.
- Bringloe DH, Rao SK, Dyer TA, Raines CA, Bradbeer JW (1996) Differential gene expression of chloroplast and cytosolic phosphoglycerate kinase in tobacco. *Plant Mol Biol* 30: 637-640.
- Brown NJ, Parsley K, Hibberd JM (2005) The future of C4 research - maize, *Flaveria* or *Cleome*? *Trends Plant Sci* 10: 215-221.
- Buchanan BB (1991) Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. *Arch Biochem Biophys* 288:1-9.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Conley TR, Park SC, Kwon HB, Peng HP, Shih MC (1994) Characterization of cis-acting elements in light regulation of the nuclear gene encoding the A subunit of chloroplast isozymes of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Biol* 14: 2525-2533.
- Cousins AB, Badger MR, Von Caemmerer S (2006) Carbonic anhydrase and its influence on carbon isotope discrimination during C-4 photosynthesis. Insights from antisense RNA in *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol* 141: 232-242.
- Cowling RM, Esler KJ, Rundel PW (1999) Namaqualand, South Africa - an overview of a unique winter-rainfall desert ecosystem. *Plant Ecol* 142: 3-21.
- Cushman JC, Bohnert HJ (1999) Crassulacean acid metabolism: Molecular genetics. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 305-332.
- Cushman JC, Taybi T, Bohnert HJ (2000) Induction of crassulacean acid metabolism – molecular aspects. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S (eds.) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, 551-582.
- Dodd AN, Borland AM, Haslam RP, Griffiths H, Maxwell K (2002) Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *J Exp Bot* 53: 569-580.
- Donath M, Mendel R, Cerff R, Martin W (1995) Intron-dependent transient expression of the maize *gap1* gene. *Plant Mol Biol* 28: 667-676.
- Finnegan PM, Suzuki S, Ludwig M, Burnell JN (1999) Phosphoenolpyruvate carboxykinase in the C₄ monocot *Urochloa panicoides* is encoded by four differentially expressed. *Genes*. *Plant Physiol* 120(4): 1033-1042.
- Furbank RT, Hatch MD, Jenkins CLD (2000) C4 photosynthesis: mechanism and regulation. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S (eds.) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, 435-457.
- Gilmartin PM, Sarokin L, Memelink J, Chua NH (1990) Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell* 2: 369-378.
- Grace S.C. (2004) Plant bioenergetics. In: *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. John Wiley & Sons, Ltd: <http://www.els.net/> [doi: 10.1038/npg.els.0001461].
- Griffiths H (2006) Plant biology: Designs on Rubisco. *Nature* 441: 940-941.
- Hatch M (2002) C4 photosynthesis: discovery and resolution. *Photosynth Res* 73: 251-256.
- Horsnell PR, Raines CA (1991) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding chloroplast phosphoribulokinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 17: 183-184.
- Jones PG, Raines CA, Lloyd JC (1995) Nucleotide sequence of a wheat chloroplastic phosphoglycerate kinase gene. *Plant Physiol* 107: 1483-1484.
- Kamber L, Feller U (1998) Influence of the activation status and of ATP on phosphoribulokinase degradation. *J Exp Bot* 49: 139-144.
- Keeley J (2003) Evolution of CAM and C-4 carbon-concentrating mechanisms. *Int J Plant Sci* 164: S55-S77.
- Ku MSB, KanoMurakami Y, Matsuoka M (1996) Evolution and expression of C-4 photosynthesis genes. *Plant Physiol* 111: 949-957.
- Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S (2000) Introduction. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S (eds.) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, 1-8.

- Long SP, Zhu XG, Naidu SL, Ort DR (2006) Can improvement in photosynthesis increase crop yields? *Plant Cell Environ* 29: 315-330.
- Luttge U (2004) Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Ann Bot* 93: 629-652.
- Marshall JS, Stubbs JD, Taylor WC (1996) Two genes encode highly similar chloroplastic NADP-malic enzymes in *Flaveria* (implications for the evolution of C₄ photosynthesis). *Plant Physiol* 111: 1251-1261.
- Martin W, Scheibe R, Schnarrenberger C (2000) The Calvin cycle and its regulation. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S (eds.) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, 9-51.
- Martin W, Schnarrenberger C (1997) The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr Genet* 32: 1-18.
- Moore PD (1994) Plant Physiology - High hopes for C₄ plants. *Nature* 367: 322-323.
- Nimmo HG (2000) The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *Trends Plant Sci* 5: 75-80.
- Nishizawa AN, Buchanan BB (1981) Enzyme regulation in C₄ photosynthesis. Purification and properties of thioredoxin-linked fructose biphosphatase and sedoheptulose biphosphatase from corn leaves. *J Biol Chem* 256: 6119-6126.
- Pavlová L (2005) *Fyziologie rostlin*. Karolinum, Praha.
- Phillips SJ, Comus PW (1999) *A natural history of the Sonoran Desert*. University of California Press, Berkeley.
- Portis AR (2002) The discovery of Rubisco activase - yet another story of serendipity. *Photosynth Res* 73: 257-264.
- Raines CA (2003) The Calvin cycle revisited. *Photosynth Res* 75: 1-10.
- Raines CA (2006) Transgenic approaches to manipulate the environmental responses of the C-3 carbon fixation cycle. *Plant Cell Environ* 29: 331-339.
- Raines CA and Lloyd JC (December 2007) C₃ Carbon Reduction Cycle. In: *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. John Wiley & Sons, Ltd: <http://www.els.net/doi:10.1002/9780470015902.a0001314.pub2>.
- Rao SK, Fukayama H, Reiskind JB, Miyao M, Bowes G (2006) Identification of C-4 responsive genes in the facultative C-4 plant *Hydrilla verticillata*. *Photosynth Res* 88: 173-183.
- Rudall P (2007) *Anatomy of flowering plants: An introduction to structure and development*. Cambridge University Press, New York.
- Ruelland E, Miginiac-Maslow M (1999) Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends Plant Sci* 4: 136-141.
- Sage RF (2004) The evolution of C-4 photosynthesis. *New Phytol* 161: 341-370.
- Sheen J (1999) C₄ gene expression. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 187.
- Tcherkez GGB, Farquhar GD, Andrews TJ (2006) Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose biphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103: 7246-7251.
- Teige M, Kopriva S, Bauwe H, Süß KH (1995) Chloroplast pentose-5-phosphate 3-epimerase from potato: Cloning, cDNA sequence, and tissue-specific enzyme accumulation. *FEBS Lett* 377: 349-352.
- Vernon DM, Bohnert HJ (1992) Increased expression of a myo-inositol methyl transferase in *Mesembryanthemum crystallinum* is part of a stress response distinct from crassulacean acid metabolism induction. *Plant Physiol* 99: 1695-1698.
- Voet D, Voet JG (1995) *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha.
- Von Caemmerer S (2004) Carbonic anhydrase and C-4 photosynthesis: a transgenic analysis. *Plant Cell Environ* 27: 697-703.
- Voznesenskaya E, Franceschi VR, Kiirats O, Artyusheva EG, Freitag H, Edwards GE (2002) Proof of C-4 photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *Plant J* 31: 649-662.
- Wedel N (1997) CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U. S.A.* 94: 10479-10484.

Použité internetové zdroje :

<http://wikipedia.org> [cit. 12.7.2008]

<http://www.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/fyzros.html> [cit. 12.7.2008]

www.biomed.cas.cz/mbu/gabriel/Biochemie%20II.ppt [cit. 12.7.2008]